Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

DIE INTRAVENÖSE INJEKTIONSTECHNIK AM BRUTEI ZUM NACHWEIS VON NATIVEN UND VORBEHANDELTEN BAKTERIELLEN ENDOTOXIEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der ehem.
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hergo Schmidt
aus Berlin

1970

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

DIE INTRAVENÖSE INJEKTIONSTECHNIK AM BRUTEI ZUM NACHWEIS VON NATIVEN UND VORBEHANDELTEN BAKTERIELLEN ENDOTOXIEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der ehem.

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hergo Schmidt

aus Berlin

ehem. Dekan: Professor Dr. med. Herbert Lax
Referent: Professor Dr. med. Klaus Großgebauer
Korreferent: Professor Dr. med. Karl-Otto Habermehl

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 12. November 1970

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

I. Herkunft und Aufbau bakterieller Lipopolysaccharide 6

II. Allgemeine biologische Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide (Endotoxine) . . 9

III. Auswahl wichtiger biologischer Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide . . . 18

1) Pyrogene und toxische Eigenschaften 18

2) Steigerung der unspezifischen Infektionsabwehr 22

3) Experimentelle Arbeiten zum Problem der Herstellung von "Endotoxoiden" 25

IV. Fragestellung der Arbeit 27

B. Experimenteller Teil

I. Material und Methoden 3o

1) Bakterielle Lipopolysaccharide und Bestimmung der LD 5o 3o

2) Endotoxinvorbehandlung mit Antibiotika . . . 31

3) Endotoxinvorbehandlung mit Lysozym 32

4) Endotoxinvorbehandlung mit Hydroxylamin

a) Herstellung der Endotoxinansätze 33

b) Herstellung verschiedener Pufferlösungen 34

c) Herstellung der Hydroxylaminlösung 35

d) Herstellung des Endotoxin-Hydroxylamingemisches 35

5) Durchführung der intravenösen Injektionstechnik am Brutei 37

6) Prinzip der Versuchsdurchführung im Schema 39

II. Ergebnisse 4o

1) Erfahrungen mit einer modifizierten intravenösen Injektionstechnik am Brutei 4o

2) Ergebnisse der Bestimmung der LD 5o dreier bakterieller Lipopolysaccharide . . . 43

3) Die Beeinflussung der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide durch verschiedene Antibiotika 46

4) Der Einfluß von Lysozym auf die toxische Wirkung von kommerziellem und vorgereinigtem bakteriellen Lipopolysaccharid . . . 49

5) Der Einfluß von Hydroxylamin auf verschiedene bakterielle Lipopolysaccharide 53

a) Wirkung von 1-molarem Hydroxylamin auf verschiedene Endotoxine nach 4-tägiger Vorbehandlung im neutralen p_H-Bereich (p_H 7.o) 53

b) Abhängigkeit der Hydroxylaminwirkung vom p_H-Wert des Inkubationsgemisches . . . 56

c) Abhängigkeit der Hydroxylaminwirkung von der Inkubationsdauer 59

C. Diskussion

I. Die Bedeutung des Bruteitestes für den Nachweis von nativen oder vorbehandelten bakteriellen Lipopolysacchariden 61

II. Die toxische Wirkung von Endotoxinen auf 12 Tage alte Hühnerembryonen 63

III. Versuche zur Detoxifizierung von bakteriellen Lipopolysacchariden 69

1) Die Beeinflussung der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide durch verschiedene Antibiotika 72

2) Der Einfluß von Lysozym auf die toxische Wirkung von kommerziellem und vorgereinigtem bakteriellen Lipopolysaccharid . . . 74

3) Der Einfluß von Hydroxylamin auf verschiedene bakterielle Lipopolysaccharide . . 77

D. Zusammenfassung 83

E. Schrifttumverzeichnis 85

A. Einleitung

I. Herkunft und Aufbau bakterieller Lipopolysaccharide

Insbesondere gramnegative Bakterien enthalten in ihrer Zellwand Lipopolysaccharidkomplexe, die durch verschiedene Extraktionsvorgänge isoliert werden und im tierischen Organismus mannigfaltige Wirkungen entfalten können. Im Schrifttum werden solche Lipopolysaccharidkomplexe uneinheitlich bezeichnet (bakterielles Pyrogen, Shwartzman-Toxin, toxisches Antigen, O-Antigen, somatisches Antigen, Boivin-Antigen, tumor necrotizing antigen, Shear Polysaccharid usw.(Eichenberger,1966), bakterielles Lipopolysaccharid oder Endotoxin). Häufig findet man den Begriff "Endotoxin".

Der chemische Aufbau dieser Verbindungen (im folgenden kurz als "Endotoxin" oder "Lipopolysaccharid" bezeichnet) ist seit den grundlegenden Arbeiten von Westphal u. Lüderitz(1954) weitgehend bekannt und soll in der Abbildung 1 schematisch wiedergegeben werden.

Obwohl an bakteriellen Endotoxinen schon ein halbes Jahrhundert gearbeitet wird, lassen sich die verschiedenen Wirkungen zur Zeit noch nicht auf bestimmte Molekülunter-einheiten zurückführen (Westphal u. Lüderitz,1954, Ribi et al,1961, Fukushi et al,1964, Göing u. Kaiser,1966). Die Zuordnung eines bestimmten Effektes zu einer ganz bestimmten Moleküleinheit ist von der Methode der Isolierung abhängig (Ribi et al,1961). Morgan u. Partridge (1942) bezeichnen den Proteinanteil als die eigentlich wirksame Komponente, während Westphal u. Lüderitz (1954), Webster et al (1955), Landy et al (1955), Ribi et al (1960) und Ribi et al (1961) Befunde vorlegen, die zeigen, daß ein proteinfreies Lipopolysaccharid alle Endotoxinwirkungen hervorrufen kann.

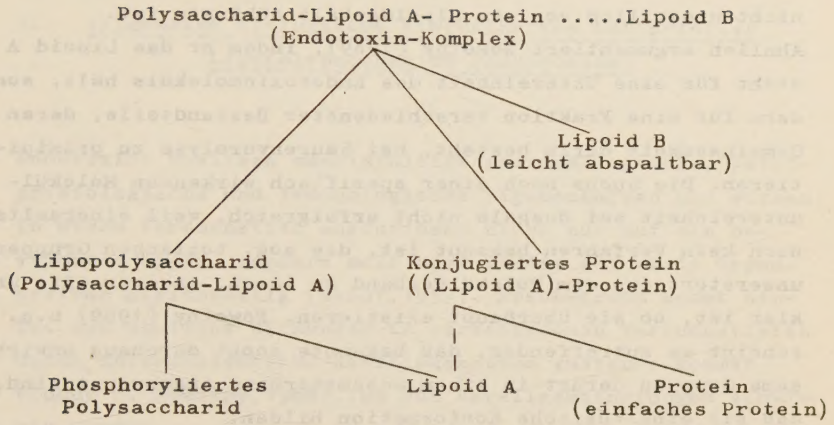


Abb 1: Die Komponenten der Endotoxin-Komplexe gramnegativer Bakterien (aus Westphal, Nowotny, Lüderitz, Hurni, Eichenberger u. Schönholzer, 1958)

Einige Autoren (Nowotny,1963, Johnson u. Nowotny,1964, Martin u. Marcus,1966, Nowotny,1968) versuchen, eine Trennung der biologischen Effekte durch chemische Umwandlung des Endotoxinmoleküls zu erreichen, andere (Watson u. Kim, 1964) sind mit Westphal u. Lüderitz der Ansicht, daß die primäre Toxizität von Endotoxin im Lipoidanteil zu suchen ist, die sekundäre aber eine Antigen-Antikörper-Reaktion darstellt.
Westphal et al (1958) kommen weiterhin zu dem Schluß, daß der von ihnen isolierte Lipoid A-Anteil stärkere biologische (insbesondere toxische) Effekte hervorruft als das nicht extrahierte Endotoxin selbst und sind daher der Auffassung, daß der sog. toxische Bestandteil der Lipopolysaccharide mit dem Lipoid A identisch ist.
Dieser Theorie widersprechen Ribi et al (1961), da sie

nachweisen können, daß die biologische Endotoxinaktivität nicht ursächlich von dem Lipoidgehalt abhängig ist.
Ähnlich argumentiert Nowotny (1969), indem er das Lipoid A nicht für eine Untereinheit des Endotoxinmoleküls hält, sondern für eine Fraktion verschiedenster Bestandteile, deren Gemeinsamkeit darin besteht, bei Säurehydrolyse zu präzipitieren. Die Suche nach einer spezifisch wirkenden Moleküluntereinheit sei deshalb nicht erfolgreich, weil einerseits noch kein Verfahren bekannt ist, die sog. toxischen Gruppen unzerstört aus dem Molekülverband zu lösen, andererseits unklar ist, ob sie überhaupt existieren. Nowotny (1969) u.a. scheint es zutreffender, daß bekannte sonst durchaus unwirksame Gruppen derart in einem Gesamtverband angeordnet sind, daß sie eine toxische Konformation bilden.
Diese Ansicht wird durch andere Befunde unterstützt (Ribi et al,1962, Ribi et al,1966, Tarmina et al,1968 I,II, siehe auch C, III), die zeigen, daß mit einer Verminderung des Molekulargewichts des Endotoxin unter eine kritische Grenze auch ein Verlust seiner biologischen Aktivität einhergeht. Deshalb vertreten diese Autoren die Ansicht, daß endotoxische Wirkungen nur dann auftreten, wenn ein Makromolekül bestimmter Größe und Zusammensetzung erhalten bleibt. Sie schränken jedoch ein, daß die Partikelgröße nicht den einzigen und wichtigsten Faktor der Toxizität darzustellen braucht.

Neben diesen Befunden und Überlegungen, die den toxischen Effekt von bakteriellem Endotoxin betreffen, konnte sichergestellt werden, daß die Polysaccharidketten des Endotoxinkomplexes eine große Bedeutung für die Gruppierung und Charakterisierung dieser Bakterien besitzen (Westphal et al,1958, Westphal et al,1964, Göing u. Kaiser, 1966).
Eine Reihe von bakteriellen Lipopolysacchariden ist seit einigen Jahren kommerziell in gereinigter Form erhältlich, so daß Untersuchungen mit standardisierten Endotoxinen möglich wurden und zu einer Vielzahl von experimentellen Ergebnissen geführt haben.

II. Allgemeine biologische Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide (Endotoxine)

Endotoxine besitzen mannigfaltige pharmakologische, pathophysiologische und immunologische Eigenschaften und wirken in einem Versuchstier anscheinend nicht nur auf ein bestimmtes Organ, sondern mehr oder minder auf viele Organsysteme gleichzeitig (Wendt, 1959). Erschwerend kommt hinzu, daß ähnliche Wirkungen in verschiedenen Versuchstieren durch unterschiedliche Reaktionsketten zustande kommen (Cundy u. Nowotny, 1968), so daß Verallgemeinerungen schwierig werden.

Es verwundert daher nicht, daß die Auffassungen in der Literatur z.T. weit auseinandergehen und die unterschiedlichsten Erklärungsmöglichkeiten herangezogen werden.

Während Stetson (1955) die Antigen-Antikörper-Reaktion als den zugrundeliegenden Mechanismus der Endotoxinwirkungen annimmt und von einem allergischen, dem Tuberkulintyp ähnlichen Wirkungsprinzip spricht, wird dieser Wirkungsmechanismus von anderen Autoren, z.B. von Suter (1964), abgelehnt oder zumindest als entscheidender Vorgang in Frage gestellt.

Smith u. Thomas (1956) stellen das Wirkungsprinzip (auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion) mit der Beobachtung in Frage, daß Endotoxin auf 10 Tage alte Hühnerembryonen toxisch wirkt; in einem Testobjekt also, das im allgemeinen als immunologisch stumm angesehen wird. Allerdings könnte nach Stetson (1961) die Hyperergie gegen Endotoxinantigene bereits genetisch verankert sein.

Im Gegensatz dazu diskutieren Watson u. Kim (1964) sowie auch Kessel, Braun u. Plescia (1966) ein Wirkungsprinzip, das sowohl die primäre Zelltoxizität, als auch die sekundären immunologischen Wirkungen nach dem Antigen-Antikörper-Mechanismus berücksichtigt. In die glei-

che Richtung weisen auch die Beobachtungen von Berger u. Fukui (1963), die zwei Endotoxinmechanismen vermuten, einen, gegen den Toleranz entwickelt werden kann und einen, gegen den keine Toleranz zustandekommt.
Andere Autoren sind jedoch der Ansicht, daß die mannigfaltigen Wirkungen des Endotoxin diesem selbst primär nicht zuzuschreiben sind, sondern erst durch Vermittlung körpereigener Substanzen entstehen.
So wurden die Stimulierung der zellulären aeroben Glykolyse (Woods et al,1961), die Freisetzung lysosomaler Hydrolasen (Berry u. Smythe,1964), die Beeinträchtigung der Zellpermeabilität mit anschließendem Austritt insbesondere von Oligodesoxyribonukleotiden (Kessel u. Braun,1965, Kessel, Braun u. Plescia,1966) bzw. der Verbrauch von Komplement (Gewurz et al,1968) als die Hauptwirkungen bezeichnet und alle übrigen Effekte als davon abhängig angesehen.

Obwohl demzufolge die grundsätzlichen Wirkungsprinzipien noch nicht völlig abgeklärt sind, soll in der folgenden Abbildung 2 der Versuch unternommen werden, die zahlreichen Wirkungen des Endotoxin in einem Schema zu erfassen, um die Übersicht zu erleichtern.
(Weitere Zusammenstellungen über Endotoxinwirkungen siehe bei: Bennett u. Cluff,1957, Wendt,1959, Atkins,1960, Gilbert,1960, Atkins u. Snell,1965, Eichenberger,1966, Göing u. Kaiser,1966, Nowotny,1969).
Schließlich werden in der Tabelle 1 in einer Auswahl, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, einige neuere experimentelle Arbeiten genannt, die sich gleichfalls mit der Endotoxinwirkungsweise befassen.

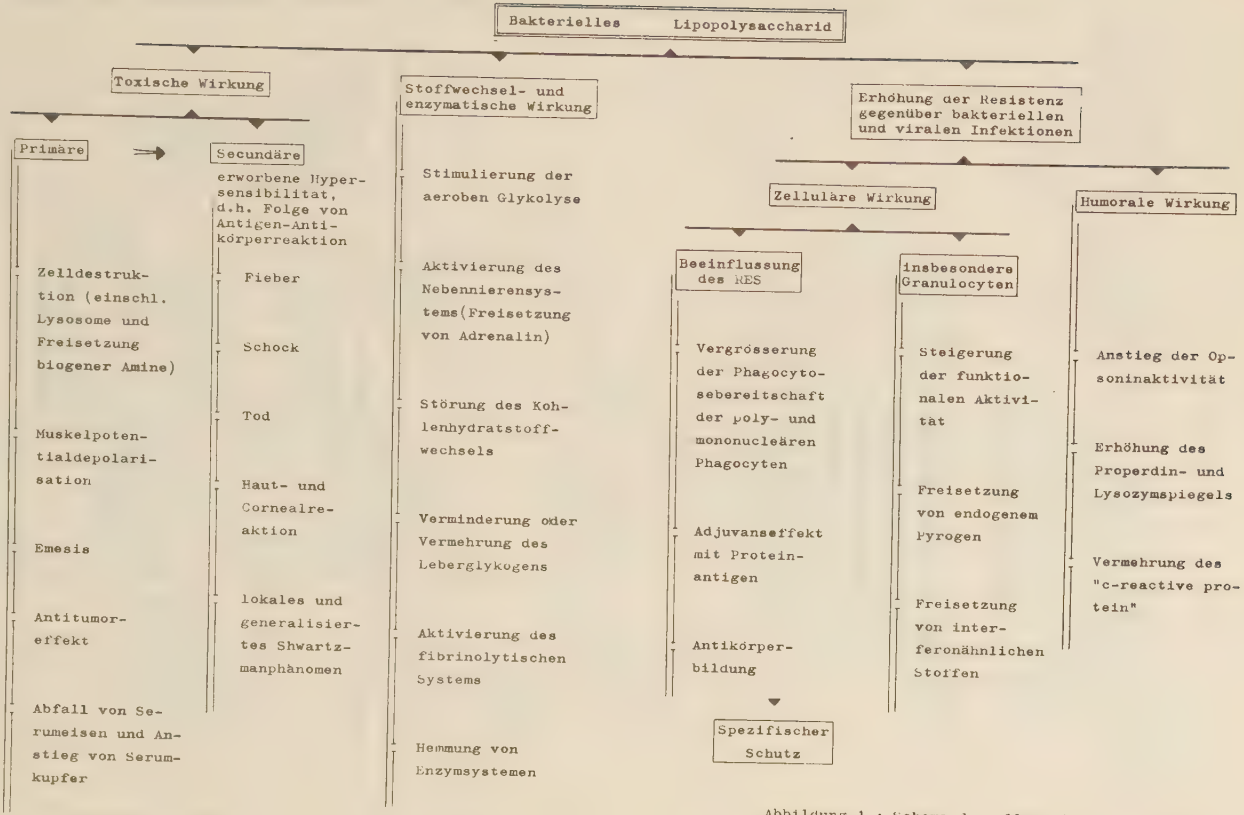


Abbildung 1 : Schema der allgemeinen biologischen Eigenschaften bakterieller Lipo-. polysaccharide

Tabelle 1: Neuere experimentelle Arbeiten zum Problem der Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide (Auswahl

Verwendete Abkürzungen

AH : Allantoishöhle
CAM : Chorioallantoismembran
ET : Endotoxin (Lipopolysaccharid)
FUDR: 5-fluoro-2-desoxyuridin
i.a.: intraarteriell
i.c.: intracutan
i.m.: intramuskulär
i.p.: intraperitoneal
i.v.: intravenös
KR : Kinetin Ribosid
NDV : Newcastle Disease Virus
s.c.: subcutan

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
1	E.coli et al.	Maus Kaninchen i.p.,s.c., i.v.	freies ET und eine nicht tox. Komponente aus Zellkulturen	Crutchley, Marsh, Cameron 1968
2	E.coli S.typhimur. Ser.marces.	Meerschw. Zellkult.	Schädigung von Makrophagen	Kessel, Braun 1965
3	E.coli	Kaninchen Zellkult.	schwere Schädigung von Makrophagen, mäßige Degeneration von Granulocyten	Heilman 1965

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
4	S.typhosa St.albus	Maus i.v., Zellkult.	unterschiedl. Leukocytenverhalten in vivo und in vitro	Wiener, Beck, Shilo 1965
5	E.coli	Kaninchen Meerschw. Zellkult.	Makrophagen zeigen keine altersabhängig unterschiedliche Empfindlichkeit gegen ET	Heilman 1968
6	Ps.pseudomallei	Kaninchen isolierte Lunge	Depolarisation des Gefäßmuskelpotentials	Hildebrand, Seys 1965
7	E.coli	Katze i.v.	Emesis	Sugiyama, Hayama, Yagasaki 1966
8	Pr.vulgaris	Maus i.c.	Antitumoreffekt	Mizuno, Yoshioka, Akamatu, Kataoka 1968
9	Br.abortus E.coli	Maus i.p.	Senkung des Serumeisenspiegels Effektaufhebung durch Triolein	Baker, Wilson 1965
1o	Br.abortus E.coli	Maus i.p.	Senkung des Serumeisenspiegels	Baker, Wilson 1965
11	gramneg. Bakterien	Kaninchen Hühnerembryo i.v.	Vergleich von tox. Wirkung auf Hühnerembryo mit pyrogener beim Kaninchen	Milner, Finkelstein 1966
12	E.coli Pseudomonas S.typhosa	Mensch Kaninchen Inf.i.v.	Ausbildung einer Fiebertoleranz während Dauerinfusion	Greisman, Woodward 1965

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
13	Br.abortus Br.meliten. E.coli H.influenz.	Meerschw. isolierter Uterus	Histaminverstärkung	Urbaschek, Versteyl, Götte 1965
14	Br.abortus E.coli Ser.marces.	Meerschw. Zellkult.	Zellschädigung in vitro bedingt durch ET-spezif. Antikörper	Kessel, Braun, Plescia 1966
15	E.coli	Affe i.a.,i.v.	arterieller Druckabfall, Emesis	Gilbert 1962
16	E.coli	Hühnerembryo CAM, i.v.	Toxizität	Hughes, Lovell 1966
17	S.abortus S.enterit. S.typhimur.	Kaninchen Maus i.v.	Erhöhung des letalen Effektes von ET nach BCG-Infektion	Suter 1964
18	S.typhosa	Maus i.v.	Empfindlichkeitssteigerung gegen bakt. Infektionen, Effektaufhebung mit Sympatholytika	Sultzer, Freedman 1965
19	E.coli	Kaninchen i.c.,i.v.	Entstehung der lokalen Shwartzmanreaktion	Schrader, Woolfrey, Brunning 1964
20	S.abortus S.enterit. S.typhosa Ser.marces.	Mensch Kaninchen Zellkult.	Stimulierung der aeroben Glykolyse	Woods, Landy, Whitby, Burk 1961
21	S.typhosa	Hühnerembryo AH	Toxizität und Hypoglykämie	Weidanz, Shaffer 1962

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
22	Ae.aerogen. E.coli Sh.flexneri	Ratte i.p.	Beeinflussung des Leberglykogens	Sanford, Barnett, Gott 1960
23	Sh.dysent.	Kaninchen i.v.	Minderung der Albumin- und Fibrinogensynthese	Koj, McFarlane 1968
24	Ser.marces. S.typhimur.	Maus i.p.	Hemmung von Enzymsystemen, Schutz durch Cortison	Berry, Smythe 1964
25	E.coli	Ratte i.p.	Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels der NN	Eberhagen, Plette 1968
26	E.coli	Meerschw. Zellkult.	antibakterieller basischer Proteingehalt in Lysosomen von Granulocyten	Zeya, Spitznagel 1963
27	Pyrusol	Kaninchen Zellkult.	proteolytischer Enzymgehalt in: Granulocyten, Makrophagen, Lymphocyten; antibakt. Enzyme in Granulocyten	Stefanovic, Absolonová 1966
28	E.coli	Maus s.c.	Induktion von Mitosen in Makrophagen	Forbes 1965
29	E.coli	Maus i.m.	unspezif. Resistenzsteigerung	Frigerio, Kierszenbaum Nejamkis 1966
30	S.typhosa	Maus i.p.	Umwandlung immunologischer Lähmung in Resist.	Brooke 1965

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
31	Ps.aerugin. S.enterit. S.typhosa	Maus i.p.	unspezif. Resistenzsteigerung, Beeinflussung mit KR	Kessel, Braun 1966
32	E.coli	Maus i.p.	nach häufiger Applikation: a) Toleranzentwicklung gegen Letalität und Leukopenie b) weitere unspezif. Resistenzsteigerung	Berger, Fukui 1963
33	E.coli S.typhosa	Kaninchen Zellkult.	Serumbehandlung vermindert leukocytäre ET-aufnahme	Noble, Koch-Weser 1966
34	S.typhosa	Kaninchen i.v.	Antigenähnlichkeit von ET und Influenzavirus	Brunner 1962
35	Ser.marces.	Maus i.p.	Adjuvanseffekt von ET, FUDR und Nukleinsäuren	Merritt, Johnson 1965
36	Ser.marces.	Kaninchen i.v.	unterschiedliche Antikörperproduktion von nativem und vorbehandeltem ET	Nowotny 1968
37	E.coli Ps.aerugin. S.typhi Sh.flexneri	Maus i.v.	Freisetzung präformierter Antikörper; Effektaufhebung mit 6-mercaptopurin	Michael 1966
38	E.coli	Kaninchen i.v.	ET-Wirkungsaufhebung durch Übertragung von 19S gamma1Immunoglobulinen	Kim, Watson 1965

lfd. Nr.	verwend. Endotoxin	Tierart Applik.	beobachtete Wirkung	Autoren
39	E.coli S.enterit. S.typhimur.	Kaninchen i.v.	Verhinderung der Antikörperbildung gegen common antigen	Suzuki, Whang, Gorzynski, Neter 1964
4o	E.coli	Kaninchen i.v.	Interferonbildung unabhängig von Umgebungstemperatur; Titererhöhung im geschorenen Tier	Postic, DeAngelis, Breinig, Ho 1966
41	Br.abortus S.typhimur. Ser.marces.	Maus i.v.	Interferonbildung	Stinebring, Youngner 1964
42	Br.abortus	Maus i.v.	kein weiterer Interferonanstieg nach wiederholten Injektionen; Titeranstieg nach BCG-Infektion	Youngner, Stinebring 1965
43	E.coli	Maus i.v.	Interferonbildung nach ET und Statolon; unabhäng. Mechanism.	Youngner, Stinebring 1966
44	E.coli	Kaninchen i.v.	Interferongrundeinheit Molgew 35ooo; im Serum zwei Aggregate	Ke, Ho 1967
45	S.typhosa	Kaninchen i.v.	interferonartiger Hemmfaktor gegen NDV	Oh, Gill 1966
46	E.coli	Kaninchen Maus i.v.	Erhöhung des C-reaktiven Proteintiters	Patterson, Harper, Hegginbotham 1968

III. Auswahl wichtiger biologischer Eigenschaften bakterieller Lipopolysaccharide

1) Pyrogene und toxische Eigenschaften

a) Das Endotoxin-Fieber

Bakterielle Lipopolysaccharide vermögen in zahlreichen Versuchstieren die Körpertemperatur zu erhöhen. Dieser Effekt tritt in typischer Weise aber nur nach Applikation bestimmter Dosen auf, die als minimale bzw. optimale pyrogene Dosis bezeichnet werden. Quantitäten, die über die optimale pyrogene Dosis hinausgehen, führen zu verminderten Temperaturen oder aber zu unregelmäßigen Fieberverläufen. Toxische Dosen lassen oft überhaupt kein Fieber auftreten (toxische Hypothermie).
Als Charakteristiken des Endotoxinfiebers gelten:

a) ca. 15min dauernde Latenzperiode zwischen Endotoxininjektion und Beginn der Temperaturerhöhung
b) zweigipfliger, sog. biphasischer Fieberverlauf
c) nach häufigen Endotoxingaben auftretende Toleranzentwicklung (Ausbleiben des Fiebers bzw. Reduzierung der Fieberstärke)

Die Ursache für die Fiebertoleranz ist im einzelnen noch unbekannt. Nach neueren Untersuchungen konnte die endotoxin-induzierte Toleranz durch zirkulierende Antikörper übertragen werden (durch 19 S-γ_1 - Immunglobuline). Kim u. Watson (1965) schlagen daher den Ausdruck "Endotoxin-Immunität" für das Toleranzphänomen vor. Interessanterweise scheinen bei Viruspyrogen z.B. andere Mechanismen wirksam zu sein.

b) Das endogene Pyrogen

Aus dem Serum fiebernder Kaninchen, Hunde oder Menschen läßt sich ein hitzelabiler Faktor isolieren, der beim Empfänger ohne Latenzperiode zu einem eingipflig verlaufenden Fieber führt und gegen den keine Toleranz entwickelt wird. Diese als endogenes Pyrogen bezeichnete Verbindung entstammt im wesentlichen den Leukocyten (Übersichten bei: Wendt, 1959, Atkins u. Snell, 1965, Cranston, 1966, Eichenberger, 1966, Göing u. Kaiser, 1966, Wood, 1966, Grossgebauer, 1967).

Göing u. Kaiser ziehen den Schluß, "daß das endogene Pyrogen nur als Teilfaktor des Endotoxinfiebers angesehen werden kann (ausgenommen, daß auch ein zentral entstehendes Pyrogen vermittelnd wirkt)" und daß "vieles doch für den zentralen Angriff bakterieller Pyrogene" spricht. Eine Reihe anderer Autoren kommt zu der Vorstellung, daß die exogenen Pyrogene (auch viele Bakterien, Pilze und Viren) als Stimulus für die Freisetzung eines leukocytären endogenen Pyrogens wirken, das seinerseits die thermoregulatorischen Hirnzentren anregt und so das Fieber bewirkt.

Noble u. Koch-Weser (1966) schließen darüberhinaus die Möglichkeit ein, daß endogenes Pyrogen erst nach einer Zellstoffwechselsteigerung entsteht. Nach neueren Untersuchungen sollen pyrogene Verbindungen (endogenes Pyrogen?) aus den Leukocytenlysosomen liberiert werden (Herion et al, 1966).

So läßt sich heute mit Eichenberger (1966) zusammenfassen, daß "die Entscheidung, ob dem endogenen Pyrogen eine pathogenetische Bedeutung beim Endotoxinfieber und möglicherweise auch bei anderen Fieberformen wie Infektionsfieber, anaphylaktisches Fieber, traumatisches Fieber zukomme", heute noch nicht getroffen werden kann.

c) Direkte und indirekte toxische Wirkungen von Endotoxin

Die Ursache der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide, d.h. der Wirkungen, die zum Tode des Versuchtiers führen, werden von den Autoren gleichfalls unterschiedlich beurteilt. Vor allem konnte nicht abgeklärt werden, ob das Endotoxin selbst (direkt), ohne die vermittelnde Rolle von anderen Verbindungen und Mechanismen, die tödliche toxische Wirkung hervorruft, oder ob ein vorheriger Kontakt mit Endotoxinantigenen hierzu erforderlich ist (allergische Reaktion).
Kessel, Braun u. Plescia (1966) vermuten, daß die Hauptwirkung der Endotoxine bei evtl. gleichzeitiger primärer Zelltoxizität wohl grundsätzlich in der Reaktion mit spezifischen, zellgebundenen Antikörpern zu suchen ist, so daß durch die Antigen-Antikörper- Reaktion nach Zellwandschädigung intrazelluläres Material insbesondere Oligodesoxyribonukleotide freigesetzt werden, die wiederum Veränderungen verursachen. Ähnlich argumentieren Berry u. Smythe (1964), die das endotoxische Wirkungsprinzip in der Freisetzung lysosomaler Hydrolasen sehen.
Kun u. Abood (1949) sehen als mögliche Todesursache von Ratten die Hemmung der Pyruvatoxidation und die damit verbundene Störung des Kohlenhydratstoffwechsels an. Andererseits vermuten Smith u. Thomas (1956), daß der Tod von 1o Tage alten Hühnerembryonen durch eine Adrenalinausschüttung zustande kommt. In die gleiche Richtung gehen auch die Vermutungen von Sanford et al (1960), welche die auftretenden Kohlenhydratstoffwechselstörungen auf eine Katecholaminfreisetzung beziehen. Gleichzeitig aber betonen sie, daß der Adrenalinfreisetzung wohl kein prinzipielles toxisches Wirkungsprinzip zuzuschreiben ist. Im ganzen sind die Untersuchungen darüber, welche Rolle die durch Pyrogene im ZNS freigesetzten biogenen Amine bei der Fieberentstehung spielen (chemische Überträgersubstanzen an den Synapsen der hypothalamischen Thermoregulationszentren?) noch un-

klar (Übersicht über diesen Teilaspekt siehe bei Cooper, 1966).
1o Tage alte Hühnerembryonen sterben möglicherweise an der auftretenden Hypoglykämie (Weidanz u. Shaffer, 1962, Finklestein, 1964). Göing u. Kaiser (1966) fassen die Ergebnisse so zusammen, daß "der Tod insbesondere der kleinen Versuchstiere (Ratte, Maus, Hühnerembryo) mit einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden" kann.
Lasch (1967) führt die Todesursache größerer Versuchstiere wie Affe, Hund usw. auf die Auslösung eines hämodynamischen Schocks zurück. In der Frühphase kann der Tod durch akutes Rechtsherzversagen und Herzrhythmusstörungen auf grund massiver Freisetzung biogener Amine zustandekommen. In der Spätphase soll er besonders durch ausgedehnte Mikrothrombosen nach Beeinträchtigung der Bluthomöostase eintreten.

Es ist demnach heute noch nicht im einzelnen zu entscheiden, welche Mechanismen nach Endotoxininjektion zum Tod des Versuchtiers führen.

2) Steigerung der unspezifischen Infektionsabwehr

Im Anschluß an die Beobachtung, daß sowohl ganze Bakterien (Field et al,1955), als auch Teile von Bakterienwänden (Rowley,1955) imstande sind, die Resistenz von Versuchstieren gegen Infektionen gramnegativer Bakterien zu erhöhen, wurde wenig später das Endotoxin als die dafür verantwortliche Verbindung ermittelt (Landy u. Pillemer,1956, Rowley,1956). Aber auch andere Stoffe (z.B. Protodyne, ein Cytoplasmabestandteil von E.coli, Fukui et al,1968) wurden mit der Resistenzentwicklung ursächlich in Verbindung gebracht.

Der erhöhten Resistenz geht meist eine Phase der Empfindlichkeitssteigerung voraus. Die eingetretene Resistenzerhöhung ist insofern unspezifisch als der betreffende Makroorganismus gegen ganz unterschiedliche Mikroorganismen und Viren (Dubos u. Schaedler,1956, Shilo,1959, Whitby et al,1961) unempfindlicher wird.

Um dieses Schutzphänomen erklären zu können, muß ein Blick auf die zellulären und humoralen Veränderungen geworfen werden, die nach Endotoxingaben auftreten.

Grundsätzlich wird die Phagocytosefähigkeit des retikuloendothelialen Systems gesteigert (Biozzi et al,1955, Howard et al,1958, Benacerraf et al,1959) und die funktionale Aktivität der Granulocyten (Cohn u. Morse II,1960) sowie der mononukleären Makrophagen (Rowley,1960) erhöht. Zudem werden interferonähnliche Stoffe ins Blut abgegeben (Stinebring u. Youngner,1964) und spezifische Antikörper gebildet (Michael,1966). Im Serum steigt der Properdinspiegel (Landy u. Pillemer,1956), außerdem wird die Opsoninaktivität angeregt (Jenkin u. Palmer,1960) und das C-reaktive Protein (Patterson et al,1968) vermehrt gefunden (siehe auch Abb. 2 und Tab. 1).

Die geschilderten Aktivitätssteigerungen unterscheiden

sich in zwei wesentlichen Punkten vom klassischen immunologischen Geschehen (Whitby et al,1961): erstens ist die Änderung bereits nach Stunden nachweisbar (schneller Wirkungseintritt) und zweitens besteht nach Applikation einer einzigen Substanz ein weiter Wirkungsbereich auch gegen antigenetisch nicht verwandte Keime (Unspezifität).

Deshalb wurden mehrere Grundmechanismen als Erklärung herangezogen:
Lee u. Stetson (1960) sprechen von der Bildung kreuzreagierender Antikörper. Benacerraf u. Miescher (1960) meinen, daß die gramnegativen Bakterien evtl. ein gemeinsames Antigen besitzen, das zur Bildung multivalenter Antikörper Anlaß gibt. Dafür spräche die Beobachtung von Suzuki et al(1964), die ein solches allgemein vorhandenes Antigen nachweisen konnten. Kessel, Braun u. Plescia (1966) weisen auf die vermittelnde Rolle der Oligodesoxyribonukleotide hin, die durch den zelltoxischen Effekt von Endotoxinen freigesetzt werden und nehmen damit an, daß Endotoxine die Resistenz durch unterschiedliche Mechanismen zu steigern vermögen (Kessel u. Braun,1966).
Endotoxine könnten die antikörper-produzierenden Zellen dann zur Teilung anregen, wenn diese vorher durch Antigene daran gehindert wurden (Brooke,1965). Evtl. werden durch Endotoxine auch antikörperähnliche Substanzen freigesetzt, Kofaktoren aktiviert oder aber generell zahlreiche spezifische Antikörperspiegel erhöht (Whitby et al,1961).

Mulholland u. Cluff (1964) bringen die Resistenzsteigerung mit Aktivitätsänderungen der Granulocyten ursächlich in Verbindung. In ähnlicher Weise sehen Woods et al(1961) die Stimulierung der aeroben Glykolyse als Beginn einer Reaktionskette, die weitere Veränderungen nach sich zieht, wie z.B. die Steigerung der Phagocytose. So sollen Glykolyse-fördernde Substanzen auch die Phagocytose anregen, während Glykolyse-hemmende Substanzen auch die Phagocytose vermindern (Cohn u. Morse I,1960). Die gesteigerte Phagocytose könnte aber auch der Grund für die

Fiebertoleranzentwicklung sein (Göing u. Kaiser,1966) oder doch zumindest ein Teilfaktor derselben (Übersicht bei Eichenberger,1966).
Neben der zellulären Stoffwechselsteigerung sehen auch Whitby et al(1961) im Auftreten von spezifischen Antikörpern den entscheidenden Schutzfaktor.
Daß Antikörper für die Pyrogentoleranz verantwortlich sind, wurde oben bereits erwähnt (III, 1a). Allerdings wird dieser Ansicht von Freedman (1960) widersprochen.
Als entscheidendes Kriterium für die Resistenzzunahme nach Applikation von bakteriellen Endotoxinen sehen Patterson et al (1968) neben der Steigerung der Granulocytenaktivität das Erscheinen von C-reaktivem Protein.

3) Experimentelle Arbeiten zum Problem der Herstellung von "Endotoxoiden"

Wie bei den bakteriellen Ektotoxinen stellt sich auch bei den bakteriellen Endotoxinen die Frage der Moglichkeit ihrer Detoxifizierung. Während das Problem für die Ektotoxine zufriedenstellend gelöst wurde, wird an der Herstellung von "Endotoxoiden" noch intensiv gearbeitet. Das sog. Endotoxoid müßte eine stark verminderte pyrogene und toxische Wirkung bei noch guten immunologischen Eigenschaften aufweisen. Die Bearbeitung dieser Frage wird allgemein als vorrangig angesehen, weil sich möglicherweise Präparationen entwickeln lassen, die in der Humanmedizin Verwendung finden könnten (Steigerung der Infektionsresistenz).

Nachdem 1954 von Hegemann entdeckt worden war, daß Serum oder Plasma vieler Tierspezies, insbesondere nach Verminderung der Kationen (Skarnes, 1966) oder Behandlung mit Heparin (Schultz u. Becker, 1967), die Toxizität und Pyrogenität von Endotoxinen zu mindern vermag, ohne die resistenzsteigernde Wirkung zu zerstören, wurde dieser Effekt in zahlreichen experimentellen Arbeiten reproduziert, und es existieren verschiedene grundlegende Wirkungsvorstellungen:
Die "entgiftende" Wirkung von Plasma soll nach Rudbach u. Johnson (1964) sowie Rudbach, Ribi u. Milner (1965) auf reversiblen, unspezifischen elektrochemischen Phänomenen beruhen. Skarnes (1966), Schultz u. Becker (1967) sowie Gupta u. Reed (1968) führen die Endotoxininaktivierung auf die Aktivität verschiedener Serumenzyme zurück. Schultz u. Becker (1967) machen wahrscheinlich, daß bei heparinvorbehandelten Tieren die entscheidende Inaktivierungsfunktion von einer Serumproteinlipase ausgeht. Im Gegensatz dazu vermutet Skarnes (1966), daß die Endotoxinentgiftung in

zwei Schritten abläuft, wobei der erste — ein Abbau des Endotoxinmoleküls — durch eine α_1-Lipoproteinesterase bedingt ist, während eine α_1-Globulinesterase den zweiten Schritt der Zerstörung aller toxischen Gruppen vollzieht. Gupta u. Reed (1968) sprechen sich ebenfalls für eine schrittweise Inaktivierung aus, bei der das Endotoxin zunächst an ein Protein gekoppelt wird. Die eigentliche Entgiftung soll durch eine Serumlipase erfolgen, an die sich schließlich die Hydrolyse der Polysaccharide mit Hilfe von hydrophilen Enzymen anschließt.

Zellhomogenate stellen weitere biologische Materialien dar, die Endotoxine detoxifizieren können. Nach Farrar u. Magnani (1964), Farrar (1965) und Farrar u. Corwin (1966) sollen z.B. Mitochondrienenzyme das Endotoxin durch Oxidation der Fettsäurekomponenten inaktivieren.

Andere Autoren verwenden anstelle von körpereigenen Bestandteilen chemische Verfahren zur Endotoxoidherstellung. So können Martin u. Marcus (I,1966) zeigen, daß eine Acetylierung von Endotoxin zu einem Produkt führt, das den geforderten Bedingungen (Dissoziation von Antigenität und Toxizität) nahe kommt.

In Arbeiten von Nowotny (1963) sowie von Martin u. Marcus (II,1966) erweisen sich Kaliummethylat- oder Pyridinformatbehandlung als geeignet, brauchbare, d.h. entgiftete Endotoxine, herzustellen. Ein so präpariertes "Endotoxoid" führt im Tierversuch nach einmaliger Applikation zu einem geringeren Anstieg des Antikörpertiters — jedoch zu einer größeren Boosterwirkung verglichen mit unvorbehandelten Endotoxinpräparationen.

Neben den genannten Verfahren zur Herstellung von bakteriellen Endotoxoiden wurde auch die Wirkung von kommerziellem Hühnereiweißlysozym auf Endotoxin untersucht. Während Badakhsh u. Foster (1966) fanden, daß Lysozym die Toxizität von Endotoxin vermindert, die resistenzsteigernde Wirkung aber erhöht, beobachteten Mergenhagen u. Martin (1964), daß Lysozym die Toxizität von Endotoxin steigert. Bisher konnte dieser Widerspruch nicht abgeklärt werden.

IV. Fragestellung der Arbeit

Das Brutei des Huhnes wurde von Smith u. Thomas (1956), Kétyi (1963), Finkelstein (1964), Powell u. Finkelstein (1966), Hughes u. Lovell (1966), Farrar u. Corwin (1966), Schultz u. Becker (1967), Cundy u. Nowotny (1968)u.a. als empfindliches Nachweissystem für bakterielles Lipopolysaccharid verwendet. Allerdings erfordert dieser Nachweis eine besondere im allgemeinen noch wenig gebräuchliche Injektionstechnik, nämlich die Applikation in embryonale Venen (sog. intravenöse Injektionstechnik).
Diese Technik ist kürzlich von Grossgebauer u. Langmaack (1967) verbessert worden, so daß bestimmte Nachteile, insbesondere Nachblutungen, weitgehend entfallen.
Mit dieser modifizierten Technik sollten die toxischen Grenzwerte einiger bakterieller Lipopolysaccharide, sowie der Einfluß verschiedener biologisch interessanter Verbindungen auf unterschiedliche Endotoxine bestimmt werden.
Wir wählten Verbindungen, die vermuten ließen, daß sie entweder durch Komplexbildung (z.B. die Antibiotika Polymyxin-B-Sulfat und Viomycinsulfat) oder durch Eingriffe an den funktionellen Gruppen (Lysozym, Hydroxylamin) die toxischen Wirkungen bakterieller Endotoxine reduzieren oder aufheben.

1) Die Bestimmung der LD 50 (50%ige Letalität) dreier bakterieller Lipopolysaccharide

Diese Arbeiten wurden aus folgenden Gründen durchgeführt: Erstens, um die wenigen publizierten Resultate über die toxisch wirkenden Grenzdosen zu überprüfen und zu erweitern, zweitens um die Dosis-Wirkungsabhängigkeit zu ermitteln (=Kontroll- und Vergleichswerte für die Inakti-

vierungsversuche) und schließlich um sich in diese spezielle Nachweismethode einzuarbeiten.

2) Die Beeinflussung der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide durch verschiedene Antibiotika

In der Literatur sind wiederholt experimentelle Daten vorgelegt worden, nach denen das Endotoxin nicht nur direkt, sondern auch auf dem Umweg über andere Serum- oder Zellkomponenten wirkt.
Interessante Verbindungen in dieser Hinsicht sind die Antibiotika, von denen bereits bekannt ist, daß z.B. Polymyxin-B-Sulfat die toxische Aktivität der Lipopolysaccharide von Aerobacter aerogenes sowie E.coli O111:B4 im Bruteitest stark reduziert (Rifkind u. Palmer, 1966, Rifkind, 1967).
Für uns war von Interesse, ob solche neutralisierenden Effekte auch bei anderen Antibiotika nachweisbar sind.

3) Der Einfluß von Hühnereilysozym auf die toxische Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide

Über solche Einflüsse ist in der Literatur wenig mitgeteilt worden. Mergenhagen u. Martin (1964) fanden, daß lysozymbehandelte, selbst präparierte Endotoxine eine höhere Toxizität für Mäuse aufweisen als unbehandelte Endotoxine. Da diese Befunde z.B. für die Entstehung des Endotoxinfiebers und der unspezifischen Infektabwehr von Bedeutung sein könnten, haben wir sie erneut aufgegriffen.
Insbesondere war von Interesse, wie sich hochgereinigte, lysozymbehandelte Endotoxine im Bruteitest verhalten (Toxizitätsanstieg nur bei inkomplett gereinigten Lipopolysacchariden ?).

4) Der Einfluß von Hydroxylamin auf verschiedene bakterielle Endotoxine

Der Einfluß von Hydroxylamin ist auf Nukleinsäuren und deren Bruchstücke sowie auf verschiedene biologische Aktivitäten von Bakterien und Viren geprüft worden (Brown u. Schell,1961, Schuster,1961, Rott,1962, Schäfer u. Rott, 1962, Bendich et al,1964, Scholtissek,1965, Tessman et al, 1965, De Vries,1965, Phillips et al,1966, Wilson u. Caicuts,1966, Lawley,1967, Omura u. Yamaguchi,1967 u.a.). Es wurde gefunden, daß Hydroxylamin neben der Auslösung mutagener Effekte insbesondere die Infektiosität von Viren rasch zerstört. Es wird angenommen, daß es trotz intensiver Einwirkung Proteine nur wenig oder gar nicht angreift.

Bisher fehlen Untersuchungen über die Wirkung von Hydroxylamin auf gereinigtes Endotoxin, eine Tatsache, auf die kürzlich Kanoh et al (1968) noch einmal nachdrücklich hinweisen. Diese Versuche sind insofern interessant, weil sie Aufschluß darüber versprechen, ob bestimmte Lipopolysaccharidwirkungen selektiv geschädigt werden können, und ob somit die Möglichkeit besteht, "Endotoxoide" auch durch Hydroxylaminbehandlung herzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob überhaupt die toxische Wirkung von Endotoxinen durch Hydroxylamin gemindert oder aufgehoben werden kann. Sodann sollte der Einfluß des p_H, der Einwirkungszeit des Hydroxylamin und der Endotoxinkonzentration auf die toxische Wirkung verschiedener bakterieller Endotoxine geprüft werden.

B. Experimenteller Teil

I. Material und Methoden

1) Bakterielle Lipopolysaccharide und Bestimmung der LD 5o

Zur Bestimmung der toxisch wirksamen Grenzdosen und der entsprechenden LD 5o Werte werden folgende drei Lipopolysaccharide der Difco Laboratories, Mich./USA verwendet:

a) LPS B E.coli 026:B6
Control 518894

b) LPS B S.enteritidis
Control 485728

c) LPS B S.typhi-murium
Control 211288

Nach Abwiegen von o,o1 g Endotoxin und Lösen in 1o ml sterilisierter, pyrogenfreier, isotonischer Kochsalzlösung (Physiologische Kochsalzlösung, Infusionslösung zur parenteralen Anwendung, Dr.E.Fresenius KG, Bad Homburg) werden die unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen durch Verdünnungsreihen bereitet.
Dabei werden stets dieselben 1o ml- und 1 ml-Pipetten verwendet, und es wird darauf geachtet, daß alle verwendeten Glasgefäße vor der Sterilisation nur mit Aqua dest. gereinigt werden.
Je Brutei wird stets ein Gesamtflüssigkeitsvolumen von o,5 ml, die entsprechende Endotoxinmenge enthaltend, injiziert.

2) Endotoxinvorbehandlung mit Antibiotika

Endotoxinpräparation:

LPS B E.coli 026:B6 (siehe B, I,1)

Antibiotika:

a)	Chloramphenicol	-Chloramphenicol, pharm., Chloromycetin, Serva Entwicklungslabor Heidelberg, M 323.1
b)	Colistinmethan-sulfonat	-Colistin parenteral, Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg im Rheinland, 1.ooo.ooo E(ca.79mg) Colistinmethansulfonat Na-salz, entspr. 33,3 mg Colistinbase
c)	Penicillin-G-Kalium	-Penicillin-G-Kalium für Testzwecke Bayer, Leverkusen 2o.ooo IE/Amp.
d)	Phenoxymethyl-penicillinkalium	-Penicillin-Heyl, "oral 4oo", Heyl & Co, Berlin 37 4oo.ooo IE/Tabl.
e)	Polymyxin-B-Sulfat	-Polymyxin-B-Pfizer, Pfizer GmbH, Karlsruhe, 5o mg/Amp.
f)	Sigmamycin	-Sigmamycin intravenös, Pfizer GmbH, Karlsruhe, 5oo mg/Amp. 214 mg Oleandomycinphosphat (entspr.166 mg Oleandomycin) +334 mg Tetracyclinhydrochlorid,gepuffert mit Ascorbinsr.
g)	Streptomycin-sulfat	-Streptomycin-Sulfat, Heyl & Co, Berlin 37 1 g/Amp.
h)	Viomycinsulfat	-Viocin, Pfizer GmbH, Karlsruhe, 1,4 g Viomycinsulfat (entspr. 1 g Viomycin)

Die Ansätze werden so hergestellt, daß 25γ des Antibiotikums mit unterschiedlichen Endotoxinmengen in o,5 ml Gesamtinokulum injiziert werden (Lösungsmittel: siehe B,I,1).

3) Endotoxinvorbehandlung mit Lysozym

Endotoxinpräparation:

LPS B E.coli 026:B6

Lysozym:

Lysozym (3.2.1.17)
3x krist., Muramidase,
N-Acetylmuramidglycanohydrolase,
Serva Entwicklungslabor Heidelberg

Nach Herstellung der Verdünnungsreihen (Lösungsmittel: sterilisierte, pyrogenfreie, isotonische Kochsalzlösung, siehe B, I,1) und Zusammengeben der beiden Lösungen wird das Gemisch 60 min bei 37,5°C inkubiert. Das Gesamtinokulum beträgt jeweils 0,5 ml je Brutei.

4) Endotoxinvorbehandlung mit Hydroxylamin

a) Herstellung der Endotoxinansätze

Neben LPS B von E.coli, S.enteritidis, S.typhi-murium (siehe B, I,1) wird auch LPS B S.flexneri (Control 211289) der Difco Laboratories, Mich./USA verwendet.
Es werden jeweils o,o1 g der oben genannten Lipopolysaccharide in 1oo ml sterilisierte, pyrogenfreie, isotonische Kochsalzlösung (siehe B, I,1) eingebracht, so daß 1 ml des Ansatzes 1oo Endotoxin enthält (Ansatz wird gründlich gemischt).
Um unterschiedliche Endotoxinmengen zu erhalten, wird — wie in der Tabelle 2 veranschaulicht — vorgegangen:

	Konzentr. A	Konzentr. B	Konzentr. C
Entnahme vom Grundansatz	1o ml	1o ml	1 ml
+Kochsalzlösg.	——	9o ml	99 ml
Entnahme von der Verdünng.	——	1o ml	1o ml
endgültiges Versuchsvolum.	1o ml	1o ml	1o ml
Endotoxinendkonzentration	1oo γ/ml	1o γ/ml	1 γ/ml

Tabelle 2 : Herstellung der Endotoxinansätze

b) Herstellung verschiedener Pufferlösungen

Um die Hydroxylaminwirkungen in verschiedenen pH-Bereichen studieren zu können, werden Puffer der p_H-Werte 3.5—5.6 und 9.2—1o.7 hergestellt. Dazu verwendete Chemikalien:

a) Essigsäure -CH_3COOH, Eisessig, chem.rein 99-1oo%, Riedel der Haen, Seelze, Hannover

b) Natriumacetat -$NaC_2H_3O_2$ +3 H_2O, pro analysi E.Merck, Darmstadt

c) Natriumcarbonat -Na_2CO_3, wasserfrei, pro analysi E.Merck, Darmstadt

d) Natriumhydrogencarbonat -$NaHCO_3$, pro analysi E.Merck, Darmstadt

Die verwendeten Pufferlösungen werden — wie in der folgenden Tabelle 3 angegeben — hergestellt:

	p_H 3.5-5.6	p_H 9.2-1o.7
Pufferart	Essigsäure-Acetat	Carbonat-Hydrogencarbonat
Stammlösung	A 12g Essigsäure auf 1ooo ml B 27,2g Natriumacetat auf 1ooo ml	A 21,2g Natriumcarb. auf 1ooo ml B 16,8g Natriumhydrogencarb. auf 1ooo ml
Versuchsansatz, Zusammensetzung I	19,5ml A +3o,5ml B auf 1oo ml auffüll	21,3ml A +3,8ml B auf 1oo ml auffüll
Kontrollansatz, Zusammensetzung II	———	8,oml A +17,oml B auf 1oo ml auffüll

Tabelle 3 : Herstellung der Pufferlösungen

In 1oo ml Puffer werden o,o1 g der bakteriellen Lipopolysaccharide eingewogen (weiteres Vorgehen nach Tabelle 2).

Die Zugabe von Hydroxylamin zu den Puffergemischen verschiebt den p_H-Wert zum Neutralpunkt hin. Um aber auch in den Kontrollansätzen (= Endotoxin ohne Hydroxylamin) den gleichen p_H-Wert zu erhalten, wurden diese mit dem gleichen Puffer auf den p_H-Wert des Versuchsansatzes angeglichen (Kontrollansatz, Zusammensetzung II in der Tab. 3).

Um evtl. auftretende Salzeffekte zu erkennen, wird in einem weiteren Kontrollversuch dem Endotoxinansatz anstelle eines Puffers (Zusammensetzung II) 1o ml einer 2 molaren Natriumchloridlösung zugesetzt. Dazu werden 58,45 g Natriumchlorid (NaCl, reinst, pro analysi, E.Merck, Darmstadt) in 5oo ml sterilisiertem, pyrogenfreiem, neutralen Wasser gelöst.

c) Herstellung der Hydroxylaminlösung

Hydroxylamin	-NH_2OH, Hydroxylaminhydrochlorid sulfatfrei, puriss., Fluka AG, Buchs SG
Natriumhydroxid	-NaOH, Plätzchenform, reinst, pro analysi, E.Merck, Darmstadt

Zu einer 4-molaren Hydroxylaminlösung wird die gleiche Menge einer 14 %igen Natriumhydroxidlösung gegeben (siehe bei Schäfer u. Rott,1962).

d) Herstellung des Endotoxin-Hydroxylamin-Gemisches

Die 2-molare Hydroxylaminlösung wird mit dem Endotoxinansatz im Verhältnis 1:1 gemischt, so daß eine 1-molare Hydroxylaminlösung vorliegt. Definitive Zusammensetzung der Versuchsansätze (Endotoxin-Hydroxylamin-Gemische) und der

Kontrollansätze (Endotoxin ohne Hydroxylamin) siehe in der Tabelle 4:

	Versuchs-ansatz neutral	Kontroll-ansatz neutral	Versuchs-ansatz basisch	Kontroll-ansatz basisch
Endotoxin in Puffer-Zusamsetz I	1o ml	1o ml	1o ml	1o ml
Hydroxyl-amin	1o ml	———	1o ml	———
Puffer	———	1o ml Kochsalz	———	1o ml Zusamsetz II
endgültig. p_H	7.o	7.o	8.5	9.5

Tabelle 4 : Zusammensetzung der Versuchsansätze (Endotoxin-Hydroxylamin-Gemisch, Pufferzusammensetzung I) und Kontrollansätze (Endotoxin ohne Hydroxyl-amin) im neutralen und basischen p_H-Bereich

Die erhaltenen Endotoxin-Hydroxylamin-Gemische und die Kontrollansätze werden 1 bis 4 Tage lang bei 2o°C unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers inkubiert. Nach dieser Zeit wird mit einem elektrischen p_H-Meter der aktuelle p_H-Wert gemessen. Anschließend werden die Ansätze ausgiebig bei +4°C gegen eine phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung dialysiert.(5-stündige Vordialyse gegen 4 Liter, 12-stündige Hauptdialyse gegen 6 Liter und anschließend 3-stündige Nachdialyse gegen 4 Liter Puffer).

Da in diesen Versuchen die je Brutei injizierte Flüssigkeitsmenge o,2 ml beträgt, werden Endotoxinmengen von 1o, 1 bzw. o,1 γ je Brutei erreicht.

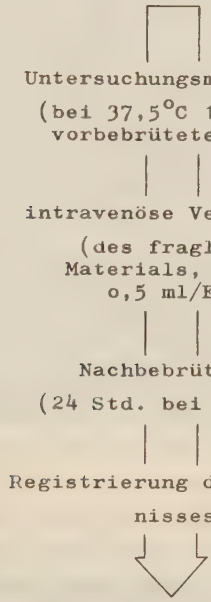
5) Durchführung der intravenösen Injektionstechnik am Brutei

Befruchtete Eier weißer Leghornhühner werden 12 Tage lang in einem sich selbst regulierenden Inkubator bei einer Temperatur von 37,5 ± o,5°C bebrütet.
Über einem Durchleuchtungsgerät werden die brauchbaren Bruteier ausgesondert. Auf der Kalkschale wird eine gut sichtbare, möglichst in der Nähe der Luftblase gelegene, mittelgroße Vene gekennzeichnet. Nach Festlegung der Blutstromrichtung und Desinfektion mit 7o vol%igem Propylalkohol wird dieser Schalenteil mit einer Lanzette entfernt. Auf die freiliegende Kalkhaut wird ein Tropfen Immersionsöl (E.Merck, Darmstadt) gegeben (siehe Abb.3). In die sich daraufhin gut darstellende Vene wird das Untersuchungsmaterial mit Hilfe einer 1 ml Constanta-Spritze nach der unter B, II,1 näher erläuterten Technik eingespritzt.
Die verwendeten 18/8 Kanülen verbleiben während der gesamten 24-stündigen Nachbebrütungszeit im Blutgefäss (Grossgebauer u. Langmaack,1967)(siehe auch Abb.4).
Erst nach diesem Zeitraum werden die Nadeln entfernt und die Embryonen entnommen. Die toxischen Effekte werden miteinander verglichen und registriert.
Für die Auswertung werden nur diejenigen Embryonen herangezogen, die entweder leben oder aber deutliche hämorrhagische Zeichen aufweisen, wie starke Blutungen im Gehirn. Diejenigen mit heller Körperfarbe oder einer Blutansammlung unterhalb der Kalkhaut werden als Nachblutung verworfen.
Die Versuche wurden mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse wichen nur unwesentlich voneinander ab.
Die erhaltenen Versuchsergebnisse werden schließlich im halblogarithmischen Maßstab auf Normalmillimeterpapier übertragen.

Abbildung 3 : Ein 12 Tage vorbebrütetes Hühnerei, dessen Kalkschale teilweise entfernt wurde. Es stellt sich ein mittelgroßes venöses Gefäß dar.

Abbildung 4 : Ein 12 Tage vorbebrütetes Hühnerei nach intravenöser Injektion des Untersuchungsmaterials. Die Kanüle verbleibt während der gesamten Nachbebrütungszeit im Blutgefäss.

6) Prinzip der Versuchsdurchführung im Schema



Bestimmung der LD 50 dreier bakterieller Lipopolysaccharide	Bestimmung der toxininaktivierenden Wirkung einiger Antibiotika	Bestimmung des Einflusses von Lysozym auf die letale Wirkung von Endotoxin	Bestimmung der toxininaktivierenden Wirkung von Hydroxylamin

Abbildung 5 : Das prinzipielle Vorgehen bei der Durchführung der Bruteiversuche

II. Ergebnisse

1) Erfahrungen mit einer modifizierten intravenösen Injektionstechnik am Brutei

Als Nachteile der intravenösen Injektionstechnik am Brutei werden die häufig auftretenden Nachblutungen (Kétyi, 1963) und die Schwierigkeiten bei der Injektion des Untersuchungsmaterials angegeben.
Die Zahl der Nachblutungen kann durch die von Grossgebauer u. Langmaack (1967) entwickelte Methode (Belassen der Kanüle während der gesamten Nachbebrütungszeit im Brutei) wesentlich vermindert werden.
Die unsichere Handhabung von Brutei und Spritze während der Injektion und bei Abnahme der Spritze, läßt sich nach unserer Erfahrung leicht überwinden, wenn man eine einfache Stützapparatur verwendet.
Das Wesentliche dieser Apparatur liegt darin, daß das Brutei in jeder denkbaren Stellung fixiert werden kann. Durch drehbare Gelenke können die Blutgefäße gut zugänglich gemacht werden.
Diese Zwecke erfüllt ein rechteckiges Brettchen, 2o x 7 cm, mit einer eiförmigen Öffnung in der Mitte, unter welcher ein Schaumgummipolster befestigt ist, das einen o,5 cm breiten Randsaum und in der Mitte eine weitere Vertiefung besitzt.
Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, wird das Brettchen an einem Gestänge befestigt, welches zwar Drehungen zuläßt, aber eine feste waagerechte Unterlage schafft.
Eine kleine Schreibtischlampe mit stark gebündeltem Lichtkegel wird so auf das Brutei eingestellt, daß der Metallschirm gerade mit dem Rand des Loches in der Kalkschale abschließt. So schafft man ein sehr helles, dem unbewaffneten Auge gut überschaubares Arbeitsfeld (Abb.7).

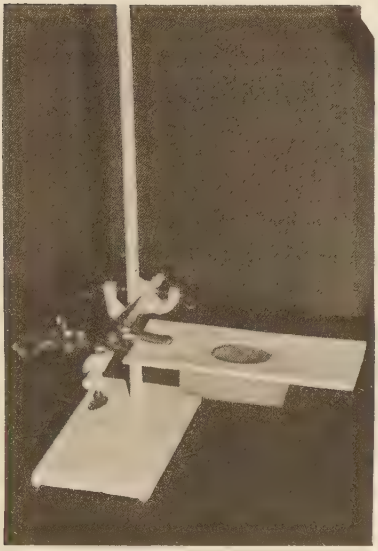


Abbildung 6 :
Stützapparatur zur intravenösen Bruteibeimpfung

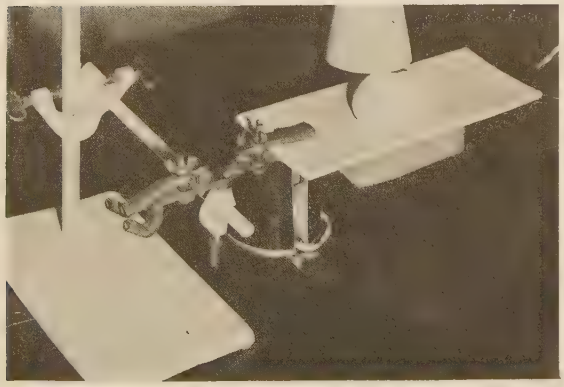


Abbildung 7 : Stützapparatur mit Brutei und Beleuchtungseinrichtung

Die so modifizierte Injektionstechnik zeigt gut reproduzierbare Ergebnisse:

1) Von 1oo zu bearbeitenden Bruteiern zeigen nur 1 - 2 während der Injektion eine Blutung und müssen daher verworfen werden.

2) Von insgesamt 2592 bearbeiteten Bruteiern konnten 2o5 wegen einer während der Nachbebrütungszeit aufgetretenen Blutung nicht zur Auswertung verwendet werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß insgesamt ca. 1o% der verwendeten Bruteier wegen Blutungen nicht zur Auswertung herangezogen werden können.

2) Ergebnisse der Bestimmung der LD 5o dreier bakterieller Lipopolysaccharide

Die Bestimmungen der Dosis-Wirkungsabhängigkeit dreier bakterieller Lipopolysaccharide (E.coli, S.enteritidis, S.typhi-murium) führen zu übereinstimmenden Resultaten, siehe Abbildung 8 und Tabelle 6.
Wie der Abbildung 8 zu entnehmen ist, besteht zwischen Endotoxinmenge und Mortalität der Embryonen eine logarithmische Abhängigkeit, d.h. die Toxizität der Endotoxinmengen steigt im größten Bereich der Kurve linear mit dem Logarithmus der Endotoxindosis (siehe auch Tab.6).
Die LD 5o der verwendeten Endotoxine liegt in der gleichen Größenordnung (Tab.5):

	E.coli	S.typhi-murium	S.enterit.
LD 5o Wert	o.oo182	o.ooo139	o.oooo183

Tabelle 5 : Die LD 5o Werte dreier bakterieller Lipopolysaccharide

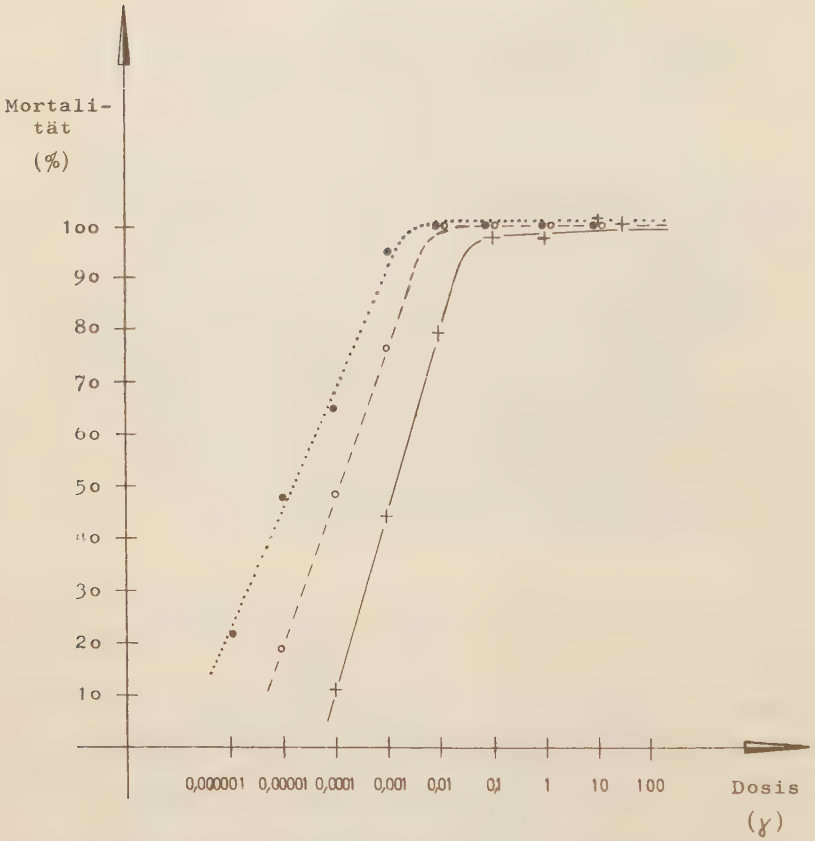


Abbildung 8: Dosis-Wirkungsabhängigkeit dreier bakterieller Lipopolysaccharide.
Die Endotoxindosen werden in einem Flüssigkeitsvolumen von 0,5 ml/Brutei injiziert.
Alle Bruteier sind 12 Tage alt.
(siehe auch Erläuterung zu Tabelle 6)

Zeichenerklärung:

—— + —— LPS E.coli

--- o --- LPS S.typhi-murium

... ● ... LPS S.enteritidis

gespritzte Endotoxin-menge (γ)	LPS E.coli		LPS S.typhi-m.		LPS S.enterit.	
	Anzahl* der Eier	Mortal.°	Anzahl der Eier	Mortal.	Anzahl der Eier	Mortal.
5o	11/11	1oo	—	—	—	—
1o	15/15	1oo	12/12	1oo	4/4	1oo
1	38/39	97,5	8/8	1oo	5/5	1oo
o,1	48/49	98,o	15/15	1oo	4/4	1oo
o,o1	39/49	79,6	24/24	1oo	13/13	1oo
o,oo1	12/27	44,5	19/25	76,o	18/19	94,8
o,ooo1	5/44	11,4	12/25	48,o	13/2o	65,o
o,oooo1	—	—	3/16	18,8	1o/21	47,6
o,ooooo1	—	—	—	—	3/14	21,4

Tabelle 6: Anzahl der je Dosis und Endotoxin untersuchten Bruteier.
Die Endotoxinmenge wurde stets in einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von o,5 ml/Brutei injiziert.

Kontrolle: Von 78 Embryonen, die o,5 ml Kochsalzlösung erhielten, waren 4 tot (= 5,1%).

Graphische Darstellung dieser Ergebnisse in der Abbildung 8.

* tot/gesamt

° Angaben in %

3) Die Beeinflussung der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide durch verschiedene Antibiotika

Zur Klärung der Wechselwirkungen zwischen Lipopolysacchariden von E.coli und Antibiotika werden acht verschiedene Antibiotika herangezogen. Um aufgetretene Effekte miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils 25γ Antibiotikum je Brutei injiziert.
Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, zeigen alle verwendeten Antibiotika, wenn sie allein injiziert werden, trotz der hohen Dosierung eine geringe Toxizität. Endotoxin von E.coli-Keimen wird in diesen Versuchen in einer Dosis angewendet, die in den Kontrollen zu einer 100 %igen Mortalität führt.

Die Kombination von Endotoxin und Antibiotikum ergibt — wie Tabelle 7 und Abbildung 9 erläutern — daß

Chloramphenicol, Penicillin-G-Kalium,
Phenoxymethylpenicillinkalium, Sigmamycin,
Streptomycinsulfat, Viomycinsulfat

die toxische Wirkung des Lipopolysaccharids E.coli 026:B6 nicht zu mindern vermögen.

Im Unterschied dazu sind die Antibiotika

Colistinmethansulfonat und
Polymyxin-B-Sulfat

imstande, die letale Wirkung des Endotoxin E.coli 026:B6 völlig aufzuheben.
Selbst 1γ/Brutei konnten von 25γ Polymyxin-B-Sulfat noch weitgehend neutralisiert werden (siehe Tab.7, Abb.9).

	Mortalität *		
	Antibiotikum (25γ)	Antibiotikum (25γ) + Endotoxin (o,1γ)	Antibiotikum (25γ) + Endotoxin (1γ)
Chloramphenicol	2/7	8/8	—
Colistinmethan-sulfonat	1/1o	o/1o	—
Penicillin-G-Kalium	1/9	1o/1o	—
Phenoxymethyl-penicillinkalium	o/8	9/9	—
Polymyxin-B-Sulfat	3/15	o/8	1/7
Sigmamycin	1/8	8/8	—
Streptomycin-sulfat	3/9	1o/1o	—
Viomycinsulfat	1/1o	1o/1o	—

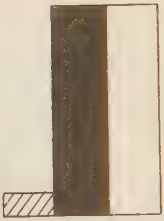
Tabelle 7: Der Einfluß von verschiedenen Antibiotika auf die toxische Wirkung von Endotoxin E.coli. 25γ des jeweiligen Antibiotikums werden mit o,1γ bzw. 1γ des Endotoxin in o,5 ml Gesamtflüssigkeitsvolumen je Brutei injiziert.

Kontrollen: Von 24 mit o,1γ Endotoxin gespritzten Bruteiern waren 24 tot (=1oo %). Von 9 mit 1γ Endotoxin gespritzten Bruteiern waren 9 tot (=1oo %).

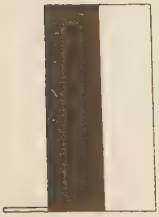
* tot/gesamt

Chloramphenicol

Colistinmethan-
sulfonat



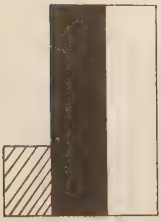
Penicillin-G-
Kalium



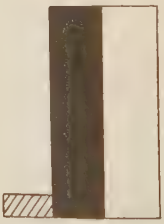
Phenoxymethyl-
penicillinkalium

Polymyxin-B-Sulfat
E.coli o,1γ

Sigmamycin



Streptomycin-
sulfat



Viomycinsulfat

Polymyxin-B-Sulfat
E.coli 1γ

Abbildung 9 : Der Einfluss von verschiedenen Antibiotica auf die toxische Wirkung von LPS E.coli. Siehe Erläuterung Tabelle 7.

Zeichenerklärung:

Antibioticum allein

LPS E.coli allein

Antibioticum und Endotoxin

4) Der Einfluß von Lysozym auf die toxische Wirkung von kommerziellem und vorgereinigtem bakteriellen Lipopolysaccharid

Zunächst wurde die Toxizität von hochgereinigtem, kommerziellem Lysozym auf den Hühnerembryo bestimmt (Abb.1o). Dabei zeigte sich einerseits, daß die Empfindlichkeit des Hühnerembryos nicht linear vom Logarithmus der Lysozymdosis abhängt und andererseits, daß Verdünnungen, die o,oo1% Lysozym enthielten, eine genügend niedrige Toxizität besitzen, um Wechselwirkungen zwischen Endotoxin und Lysozym anzeigen zu können. Im folgenden sind daher alle Untersuchungen mit einer Lysozymkonzentration von o,oo1% durchgeführt worden.
Endotoxin aus E.coli-Keimen erschien in einem Konzentrationsbereich von o,o1γ bis o,ooo1γ/Brutei geeignet. Die damit erhaltenen Kontrollergebnisse unterstützen die vorher mehrfach durchgeführten Toxizitätsuntersuchungen (siehe B, II,2; Abb.8 und Tab.6).

Mischungen von hochgereinigtem Endotoxin E.coli mit Lysozym (Inkubation der Gemische: 6o min bei 37,5°C) wiesen im Hühnereitest eine höhere Toxizität auf als Endotoxin E.coli -Präparationen ohne Lysozym. Die Toxizität der Endotoxin-Lysozym-Gemische ist um einen durchschnittlichen Betrag von 7,7% verstärkt (siehe Abb.11; Versuch a: - 5,7%, Versuch b: + 12,6%, Versuch c: + 16,2%).
Hierbei handelt es sich offensichtlich nicht um eine lysozymbedingte Steigerung der Endotoxinwirkung. Addiert man nämlich die Toxizität beider allein injizierter Substanzen — Endotoxin sowie Lysozym — , so ergibt sich stets eine höhere Gesamtmortalität als es das Inkubationsgemisch (Endotoxin und Lysozym) im Versuch tatsächlich aufweist.
Der Unterschied zwischen der theoretisch errechneten und der tatsächlich beobachteten Toxizität des Inkubationsge-

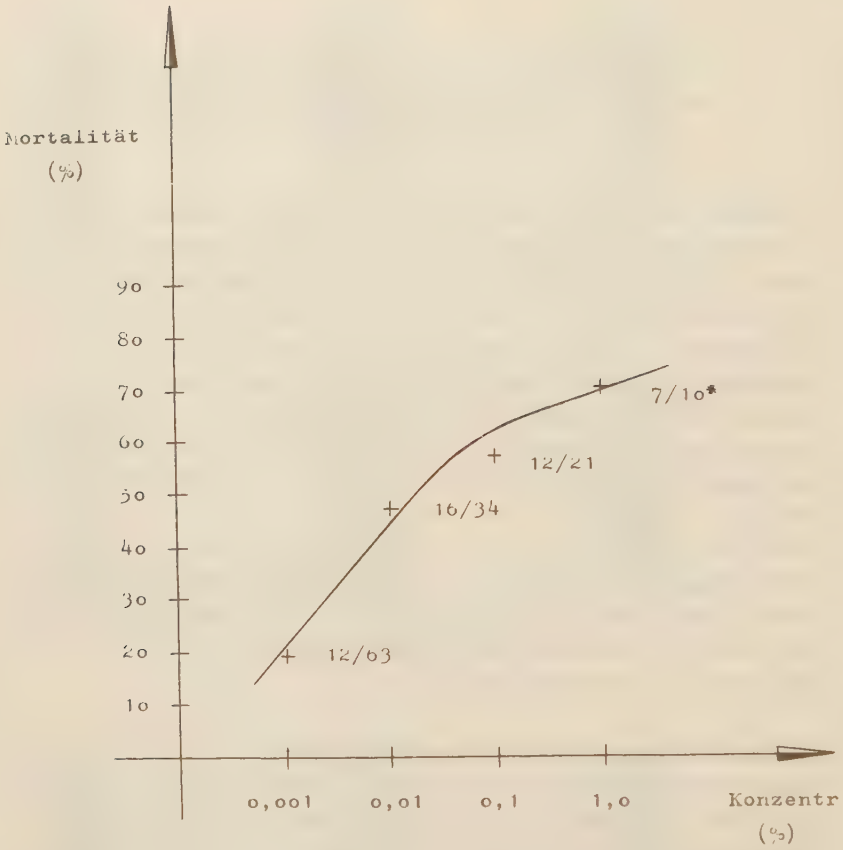


Abbildung 10: Toxizität von hochgereinigtem Lysozym auf 12 Tage alte Hühnerembryonen. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt in allen Versuchen 0,5 ml/Brutei. Die Zahlen neben der Kurve geben die pro Konzentration untersuchten Bruteier an.

* tot/gesamt

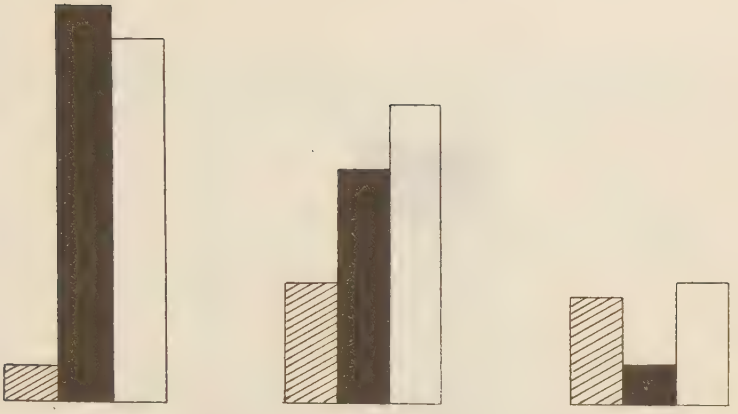


Abbildung 11: Der Einfluß von hochgereinigtem Lysozym auf die toxische Wirkung von Lipopolysaccharid E.coli. Lysozym wird in allen Versuchen als o,oo1%ige Lösung verwendet.
Endotoxin E.coli wird in folgenden Konzentrationen untersucht:

Versuch a : o,o1 γ/Brutei
Versuch b : o,oo1 γ/Brutei
Versuch c : o,ooo1 γ/Brutei

In allen Versuchen wird ein Gesamtflüssigkeitsvolumen von o,5 ml/Brutei injiziert. Die Zahlen unterhalb der Schemata geben die Menge der untersuchten Bruteier an.

Zeichenerklärung:
- Lysozym allein, o,oo1%
- LPS E.coli allein
- Lysozym und LPS E.coli

* tot/gesamt

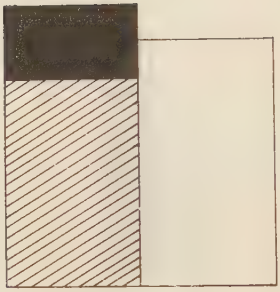


Abbildung 12: Projektion des toxischen Wirkungsanteils von Lysozym allein (▨) und Endotoxin E.coli allein (■) auf die Toxizität der Kombination Endotoxin und Lysozym (▭). Als Beispiel werden die Verhältnisse des Versuches c (Abb.11) verwendet.

misches beträgt:

Versuch a:	12,o%
Versuch b:	1o,5%
Versuch c:	3,8%

Es besteht also eher die Tendenz, daß Lysozym die Toxizität von hochgereinigtem Endotoxin vermindert (graphische Darstellung der Verhältnisse des Versuches c in der Abb.12)

5) Der Einfluß von Hydroxylamin auf verschiedene bakterielle Lipopolysaccharide

a) Wirkung von 1-molarem Hydroxylamin auf verschiedene Endotoxine nach 4-tägiger Vorbehandlung im neutralen p_H-Bereich (p_H 7.o).

Endotoxine verschiedener Bakterien zeigen in einer NaCl-Lösung auch nach 4-tägiger Inkubation bei 2o°C in hohen Dosen (1oγ/Brutei) keinerlei Toxizitätsabnahme, während die 4-tägige Vorbehandlung mit Hydroxylamin bei p_H 7.o einen gewissen Toxizitätsschwund der Endotoxine erkennen läßt (Tabelle 8).

	Mortalität *	
	Endotoxin + Hydroxylamin	Endotoxin + NaCl
E.coli	15/17	7/7
S.enteritidis	27/36	4/4
S.flexneri	19/2o	7/7
S.typhi-murium	31/35	6/6

Tabelle 8: Der Einfluß von 1-molarem Hydroxylamin auf verschiedene Endotoxine nach 4-tägiger Vorbehandlung bei p_H 7.o (2o°C).
Die Endotoxindosis von 1oγ wird in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von o,2 ml/Brutei injiziert.

Kontrolle: Von 16 Embryonen, die o,2 ml einer ebenso behandelten Pufferlösung erhielten, waren Null tot.

* tot/gesamt

Untersucht man diesen Inaktivierungseffekt von Hydroxylamin im neutralen p_H-Bereich mit verminderten Endotoxindosen, so resultieren deutliche Toxizitätsabnahmen — wie aus der Tabelle 9 am Beispiel des Endotoxin E.coli zu ersehen ist:

Dosis (γ)	Mortalität *	
	LPS E.coli + Hydroxylamin	LPS E.coli + NaCl
1o	15/17	7/7
1	19/28	13/14
o,1	15/24	24/25

Tabelle 9: Der Einfluß von 1-molarem Hydroxylamin auf Endotoxin E.coli nach 4-tägiger Vorbehandlung bei 2o°C und einem p_H-Wert von 7.o.
Die unterschiedlichen Endotoxindosen werden in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von o,2 ml/Brutei injiziert.

* tot/gesamt

Berechnet man anhand dieser Ergebnisse die prozentuale Inaktivierung des toxischen Wirkungsanteils von Endotoxin E.coli, so läßt sich zeigen (Abb.13), daß die toxische Komponente des Endotoxin dosisabhängig linear vermindert wird.

Die prozentuale Inaktivierung ergibt sich aus:

$$\text{proz. Inakt.} = \frac{\text{Mortaltät Kontr.} - \text{Mortalität Vers.}}{\text{Mortalität Kontr.}} \times 1oo$$

Kontr. = Kontrolle(%): Endotoxin und NaCl

Vers. = Versuch (%): Endotoxin und Hydroxylamin

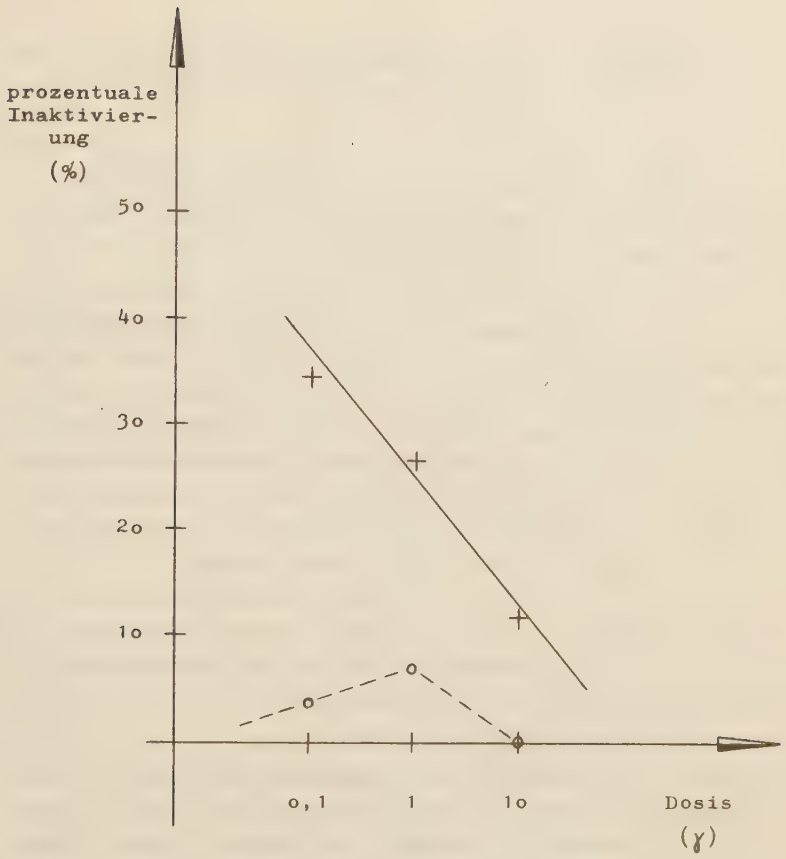


Abbildung 13: Die prozentuale Inaktivierung der Toxizität von Endotoxin E.coli nach 4-tägiger Vorbehandlung mit Hydroxylamin bei 2o°C und einem p_H-Wert von 7.o .

Zeichenerklärung: —— + —— Endotoxin und Hydroxylamin

--- o --- Endotoxin und NaCl

b) Abhängigkeit der Hydroxylaminwirkung vom p_H-Wert des Inkubationsgemisches

Geringfügige p_H-Veränderungen des Inkubationsgemisches — Endotoxin und Hydroxylamin — führen zu einer erheblichen Verschiebung der detoxifizierenden Hydroxylaminwirkung.

Wird die 4-tägige Inkubation bei einem p_H-Wert von 6.4 durchgeführt, so zeigt hydroxylaminbehandeltes Endotoxin in einer Dosis von 0,1γ/Brutei eine 95%ige Mortalität, d.h. die Toxizität wird bei diesem p_H-Wert von Hydroxylamin praktisch nicht beeinflußt. Wie im voranstehenden Kapitel näher erläutert wurde, vermag Hydroxylamin bei p_H 7.0 die Toxizität des Endotoxin auf 62,5% zu verringern, und es ergibt sich im Vergleich mit den Kontrollwerten eine signifikante Toxizitätsminderung.

Die 4-tägige Inkubation von Endotoxin mit Hydroxylamin bei einem p_H-Wert von 8.0 führt zum völligen Verlust der Endotoxinwirkung auf den Hühnerembryo (für einen Dosisbereich, der um 3 Zehnerpotenzen größer als die LD 50 ist; siehe Abb.14 und Tab.10).

Daß der Toxizitätsverlust des Endotoxin tatsächlich durch Hydroxylamin verursacht wird und nicht auf einen reinen p_H-Effekt zurückgeht, beweisen die Kontrollansätze (Endotoxin ohne Hydroxylamin), die stets so eingestellt wurden, daß ihr p_H-Wert dem des Endotoxin-Hydroxylamin-Ansatzes entspricht und in einigen Kontrollen sogar übertrifft (Tab.10).

Ebenso konnte ausgeschlossen werden, daß reine Salzeffekte die Inaktivierung verursachen (siehe Tab.10).

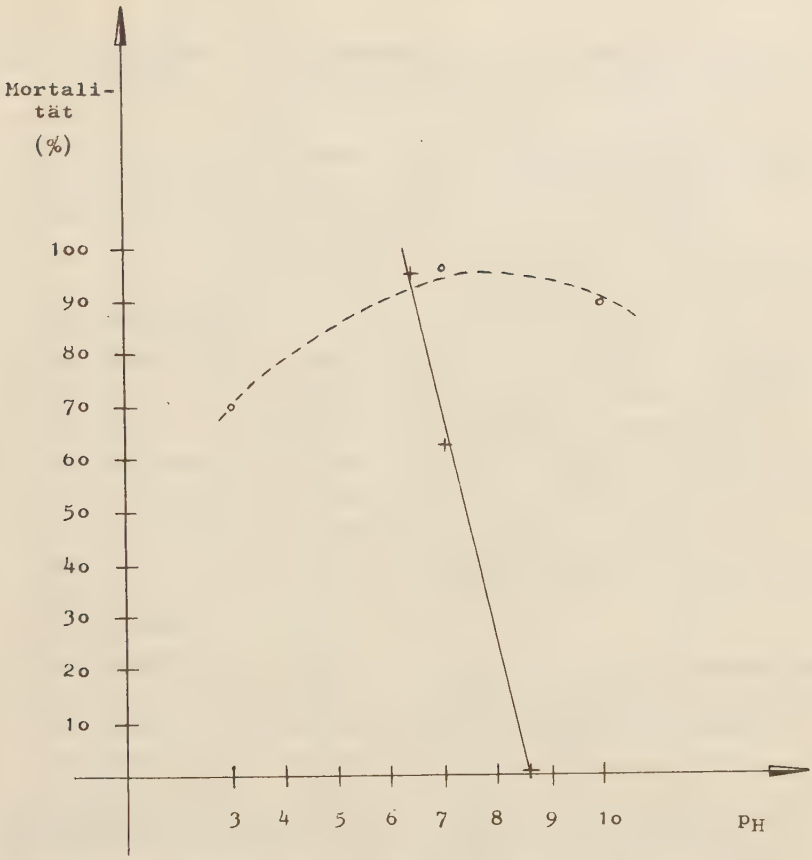


Abbildung 14 : p_H Abhängigkeit der toxizitätsinaktivierenden Wirkung von Hydroxylamin auf Endotoxin E.coli. In allen Versuchen wurden o,1γ Endotoxin in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von o,2 ml/Brutei injiziert. Die Hydroxylaminvorbehandlung wurde 4 Tage lang bei 2o°C mit verschiedenen Puffergemischen der p_H-Werte 6.4 — 7.o — 8.o durchgeführt. Die Kontrollansätze (Endotoxin ohne Hydroxylamin) hatten p_H Werte von 3.o — 7.o — 1o.o

Zeichenerklärung: siehe Abbildung 13

	Dosis (γ)	p_H	Mortalität*	
			Endotoxin + Hydroxylamin	Endotoxin + Puffer
E.coli	o,1	6.4	19/2o	—
	o,1	3.o	—	7/1o
E.coli	o,1	8.6	o/47	—
	o,1	1o.o	—	43/47
S.enterit.	o,1	8.5	2/2o	—
	o,1	1o.o	—	8/1o
S.typhi-m.	o,1	8.5	o/2o	—
	o,1	1o.1	—	1o/11
E.coli	1,o	8.9	1/17	—
	1,o	8.3ø	—	16/16
S.enterit.	1,o	8.7	1/3o	—
	1,o	8.5ø	—	14/15
S.typhi-m.	1,o	8.6	1/23	—
	1,o	8.5ø	—	11/13

Tabelle 1o: p_H Abhängigkeit der toxizitätsinaktivierenden Wirkung von Hydroxylamin auf Endotoxine. Alle Versuche sind mit 4-tägiger Hydroxylaminvorbehandlung bei 2o°C und dem angegebenen p_H-Wert durchgeführt. Injiziertes Gesamtflüssigkeitsvolumen o,2 ml/Brutei.

* tot/gesamt

ø bei diesen Versuchen wurde anstelle des Puffers (Zusammensetzung II, siehe B, I,4) eine 1-mol. Kochsalzlösung verwendet.

c) Abhängigkeit der Hydroxylaminwirkung von der Inkubationsdauer

Wird die Einwirkungszeit von Hydroxylamin auf Endotoxin E.coli bei einem p_H-Wert von 8.6 und einer Temperatur von 2o°C zwischen 1 und 4 Tagen variiert, ergeben sich interessante Veränderungen der Endotoxintoxizität (Abb.15 und Tab.11).

Nach 24-stündiger Hydroxylamineinwirkung (p_H-Wert 8.6) ist die Toxizität von Endotoxin bereits auf 31,8% vermindert, während im Kontrollansatz (Endotoxin ohne Hydroxylamin) 1oo% der Hühnerembryonen tot sind. Nach 2 Tagen Inkubation hat die Toxizität weiter wesentlich abgenommen und beträgt jetzt nur noch 4,3%. Nach 3-tägiger Inkubationsdauer steigt die Toxizität aber wieder auf 26,5%, um schließlich am 4. Tag auf 0% zu fallen. In den Kontrollansätzen zeigt sich über die gesamte Zeitspanne eine Endotoxintoxizität von nahezu 1oo% (Tab.11).

Die Zunahme der Endotoxintoxizität am 3.Tag der Inkubation kann wohl deshalb nicht als experimentell bedingtes Geschehen beurteilt werden, weil diese Toxizitätssteigerung in zwei getrennten, aber völlig identisch durchgeführten Versuchen zu beobachten war.

	Inkubationsdauer			
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
Mortalität * LPS E.coli + Hydroxylamin	7/22	2/47	13/49	o/21
Mortalität * LPS E.coli + Puffer	14/14	43/44	45/47	17/18

Tabelle 11: Abhängigkeit der toxizitätsinaktivierenden Wirkung von Hydroxylamin auf Endotoxin E.coli von der Inkubationsdauer. Siehe Erläuterung Abbildung 15.

* tot/gesamt

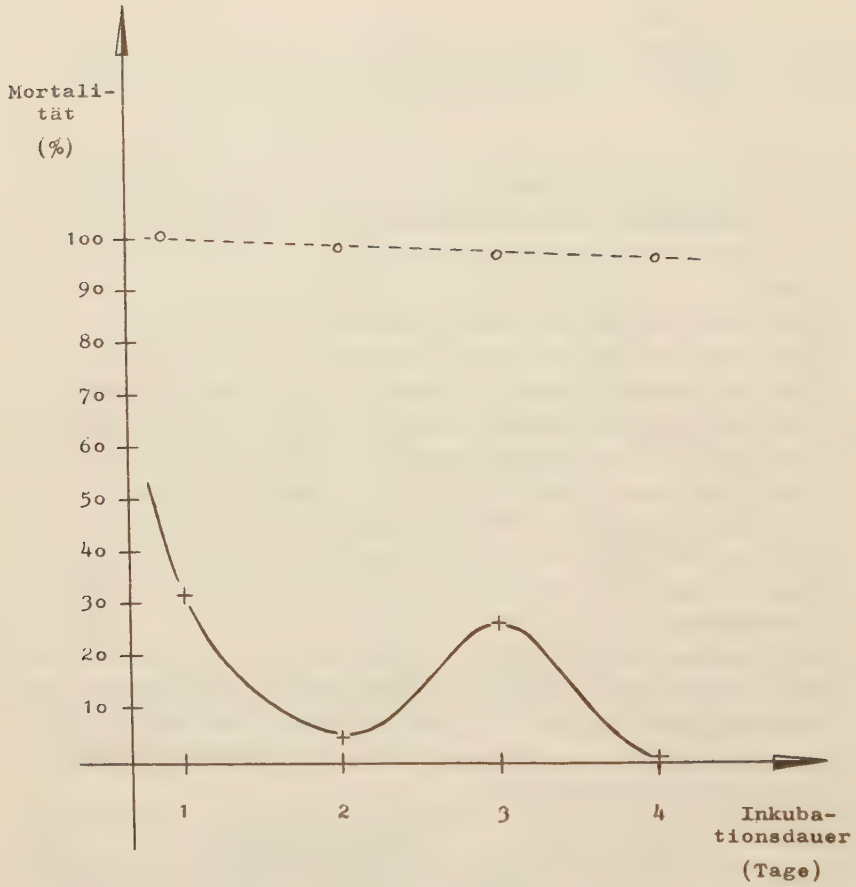


Abbildung 15: Abhängigkeit der toxizitätsinaktivierenden Wirkung von Hydroxylamin auf Endotoxin E.coli von der Inkubationsdauer. In allen Versuchen wurden o,1γ Endotoxin in einer Gesamtflüssigkeitsmenge von o,2 ml/Brutei injiziert. Die Inkubation wurde bei einem p_H-Wert von 8.6 und bei einer Temperatur von 2o°C durchgeführt.
Kontrollansätze hatten einen p_H-Wert von 9.7

Zeichenerklärung: —— + —— Endotoxin und Hydroxylamin
--- o --- Endotoxin und Puffer

C. Diskussion

I. Die Bedeutung des Bruteitestes für den Nachweis von nativen oder vorbehandelten bakteriellen Lipopolysacchariden

Der augenblickliche Stand der Endotoxinforschung läßt viele Fragen offen. So bleibt unklar, ob eine bestimmte Endotoxinuntereinheit oder ob die Konfiguration des Gesamtmoleküls für die mannigfaltigen Endotoxinwirkungen verantwortlich ist (siehe A, I und C, II). Es ist nicht geklärt, ob Endotoxin primär Zellen anzugreifen vermag oder ob Antikörper den Effekt vermitteln müssen (siehe A, II und C, II). Auch ist die Auslösung spezieller Effekte, wie die der Toxizität z.B.,ursächlich noch nicht abgeklärt (siehe C, II), und es erscheint daher ausgesprochen schwierig, ein optimales Versuchsmodell zu finden.

Kaninchen und Mäuse werden, trotz der Nachteile dieser Tierspezies, am häufigsten als biologische Testobjekte herangezogen.

Bereits 1956 wurde von Smith u. Thomas die intravenöse Injektion von Endotoxin in 1o Tage alte Hühnerembryonen eingeführt, eine Technik, die in der Folgezeit nur im geringeren Ausmaß Verwendung fand und erst ganz allmählich häufiger zum Nachweis von bakteriellen Endotoxin benutzt wird.

Dabei handelt es sich — wie Finkelstein (1964) zusammenfaßt, um ein nahezu ideales Versuchsmodell zur Lösung von Endotoxinproblemen: Hühnerembryonen sind billig, leicht und das ganze Jahr über zu erhalten, einfach zu handhaben und können als nahezu keimfrei und immunologisch inert betrachtet werden. Blut, Gewebe u.ä. läßt sich für histologische oder biochemische Versuche ohne Schwierigkeiten gewinnen und der Tod des Embryos, der oft schon in Stunden eintritt, ist ein leicht zu bestimmender experimenteller Befund.

Darüberhinaus sind alle Bestimmungen am Brutei außerordentlich gut reproduzierbar (Kétyi, 1964, Milner u. Finkelstein, 1966) und unterliegen keinen saisonbedingten Schwankungen (Kaplan, 1960). Die Empfindlichkeit der Methode übertrifft diejenige der Mäusetoxizitätsbestimmung erheblich und steht nicht wesentlich hinter dem Kaninchenpyrogentest zurück (Kétyi, 1964, Milner u. Finkelstein, 1966). Schließlich besteht zwischen der Mortalität und dem Logarithmus der Dosis eine geradlinige Abhängigkeit (Finkelstein, 1964, Farrar u. Corwin, 1966, Milner u. Finkelstein, 1966, eig. Untersuchungen, 1968) und die Befunde sind insofern eindeutiger als es nicht zur Miterfassung sog. thermolabiler Pyrogene kommt (Kétyi, 1964).

Als Nachteile der intravenösen Injektionstechnik am Brutei werden die häufig auftretenden Nachblutungen (Kétyi, 1964) und die Schwierigkeiten bei der Injektion des Untersuchungsmaterials angegeben. So sprechen Rifkind u. Palmer (1966) wegen technischer Schwierigkeiten von einer unspezifischen Mortalität von 22,7% bei 211 Kontrolltieren.

Die Zahl der Nachblutungen kann durch die von Grossgebauer u. Langmaack (1967) entwickelte Methode wesentlich vermindert werden (in unseren Versuchen: 8,6%).

Die Schwierigkeiten bei der Injektion des Untersuchungsmaterials lassen sich durch Verwendung einer einfachen Stützapparatur umgehen.

Unseren Erfahrungen zufolge ist die intravenöse Injektionstechnik am Brutei empfindlich, reproduzierbar, leicht erlernbar und daher empfehlenswert.

II. Die toxische Wirkung von Endotoxinen auf 12 Tage alte Hühnerembryonen

Die Empfindlichkeit des Hühnerembryos gegenüber Bakteriensuspensionen oder gereinigten bakteriellen Lipopolysacchariden hängt entscheidend vom Alter der Bruteier ab (Smith u. Thomas, 1956, Kaplan, 1960, Finkelstein u. Ramm, 1962, Finkelstein, 1964, Hughes u. Lovell, 1966 II, Powell u. Finkelstein, 1966). Es wird allgemein angenommen, daß sich die Empfindlichkeit mit höherem Alter verringert, nur Powell u. Finkelstein (1966) bezeichnen 19 Tage alte Embryonen als endotoxinempfindlicher als 16 Tage alte.
Als Ursache werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So wird einerseits die mit dem Alter des Embryos zunehmende Ausbildung der Nebennierenrinde (Smith u. Thomas, 1956), andererseits die Um- und Ausbildung der eigentlichen Nierenfunktion (Finkelstein u. Ramm, 1962) und schließlich die Fähigkeit des Embryos, den Blutglukosespiegel konstant zu halten (Weidanz u. Shaffer, 1962), für die veränderte Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Endotoxinen verantwortlich gemacht.
Da der Hühnerembryo im Alter von 10 Tagen die geringste Abwehrkraft besitzt, im Alter von 13 Tagen am differenziertesten reagiert (Powell u. Finkelstein, 1966), schien ein dazwischenliegendes Embryonenalter zum Studium von nativen und vorbehandelten Endotoxinen am zweckmäßigsten. Aufgrund entsprechender Vorversuche sind daher alle vorliegenden Untersuchungen an 12 Tage alten Bruteiern durchgeführt worden.

Obwohl bis zu 0,8 ml Flüssigkeit in die Vene eines 10 Tage alten Hühnerembryos injiziert werden können, arbeiteten die meisten Autoren mit 0,1 ml (Kétyi, 1964). Bei einem Großteil unserer Untersuchungen haben wir eine Gesamtflüssigkeitsmenge von 0,5 ml je Brutei ohne nachteilige Folgen injiziert. Von 78 Kontrolltieren, die 0,5 ml einer

physiologischen Kochsalzlösung erhielten, waren lediglich 4 tot (5,1%).
Vergleicht man die Ergebnisse der LD 5o Bestimmung und der Dosis-Wirkungsabhängigkeit mit den in der Literatur angegebenen Daten, so findet sich eine weitgehende Übereinstimmung (Finkelstein,1964, Farrar u. Corwin,1966, Hughes u. Lovell, 1966 I, Milner u. Finkelstein,1966, Rifkind u. Palmer,1966, Gruninger u. Spink,1967). Die Empfindlichkeit des Bruteis gegenüber den drei geprüften, verschiedenen Endotoxinen steigt linear mit dem Logarithmus der Dosis, die LD 5o ergab sich als praktisch brauchbares Charakteristikum und war gut reproduzierbar.

Es bleibt jedoch ungeklärt, welche Wirkungsmechanismen nach Endotoxininjektion eigentlich ausgelöst wurden und welche Faktoren den Tod des Hühnerembryos verursachen.
Wirkt Endotoxin primär toxisch oder wirkt es auf dem Umweg einer Hyperergie? Die Ähnlichkeiten zwischen bakteriellen hyperergischen Reaktionen und speziellen Endotoxinwirkungen wie Hautreaktion, Shwartzmanphänomen, Schock und Tod sind so weitgehend, daß teilweise allgemein die Endotoxineffekte auf Antigen-Antikörper-Reaktionen zurückgeführt werden (Stetson,1955, Lee u. Stetson,196o, Kováts,1961, Netzer u. Vogt,1964, Kováts u. Vegh,1967 u.a.). Allerdings ist Endotoxin im Brutei bereits beim ersten Kontakt toxisch, in einem Versuchsmodell also, das als immunologisch inaktiv angesehen wird (Smith u. Thomas,1956, Finkelstein,1964). Es ist daher die zusätzliche Annahme erforderlich, daß durch einen fortlaufenden Antigenkontakt der Elterntiere die Hyperergie bereits genetisch verankert ist (Stetson,1961).

Ein anderer Wirkungsmechanismus, der verschiedentlich angenommen wird, besteht in der direkten, primär toxischen Wirkung von Lipopolysacchariden (Watson u. Kim,1964, Heilman,1965, Kessel,Braun u. Plescia,1966). Dabei wäre denkbar, daß primäre Lipopolysaccharideffekte geringere, sekundäre (hyperergische) aber stärkere Auswirkun-

gen auf den Organismus besitzen.

Es bleibt weiterhin noch zu klären, ob eine bestimmte Endotoxinuntereinheit oder aber die Gesamtstruktur für die biologischen Effekte des Endotoxin verantwortlich zu machen ist, d.h. mit anderen Worten, welcher Anteil des Moleküls das toxische Prinzip beinhaltet. Entweder enthält bakterielles Endotoxin sog. toxische Gruppen, die auch isoliert wirksam wären, oder es besteht aus funktionellen Gruppen in solch einer Anordnung, die das Gesamtmolekül toxisch werden lassen.
Das Zutreffen der ersten Hypothese kann bisher schon deshalb nicht geklärt werden, weil zur Zeit kein Verfahren bekannt ist, diese sog. toxischen Gruppen aus dem Gesamtverband zu isolieren, ohne sie zu zerstören.
Zur Zeit scheint es zutreffender, daß überall vorkommende und sonst unwirksame Komponenten — wie Kohlenhydrate, Fettsäuren, Phosphorsäuren und Aminosäuren — derart in einem Gesamtverband angeordnet sind, daß sie eine toxische Konformation bilden (Nowotny, 1969).
Ein Teil der Autoren vertritt dabei die Ansicht, daß die Komponenten, die die Toxizität bedingen, im Lipoid A (Westphal et al, 1958) oder zumindest doch im Lipidanteil des Endotoxinmoleküls zu suchen sind (Watson u. Kim, 1964, Farrar u. Corwin, 1966, Martin u. Marcus, 1966, Nowotny, 1969). Andere Autoren argumentieren, daß Endotoxin aus gleichförmigen Untereinheiten aufgebaut ist. Die isolierten Untereinheiten zeigen keine toxischen Wirkungen; vielmehr entsteht das toxische Molekül erst mit der Koordination mehrerer dieser Einheiten nach einem festen Bauprinzip (Haskins et al, 1961, Ribi et al, 1961, 1962, 1964, 1966, Milner et al, 1963, Rudbach et al, 1966, Tarmina et al, 1968).

Darüberhinaus hängen die Reaktionsmechanismen von der Art des Versuchstieres ab (Cundy u. Nowotny, 1968). Die toxische Wirkung von Endotoxin auf das embryonierte Ei ist daher möglicherweise gar nicht mit derjenigen auf andere Versuchstiere zu vergleichen (Finkelstein, 1964).

Die Entstehung des toxischen Effektes wird grundsätzlich unterschiedlich beurteilt. Während ein Teil der Autoren annimmt, den letalen Effekt mehr oder minder isoliert betrachten zu können, sieht der andere Teil diese spezielle Wirkung in Zusammenhang mit den übrigen Phänomenen.

Zusammenfassung einzelner Argumente:

Die toxische Wirkung von Endotoxin beruht auf der Hemmung der Pyruvatoxidation und den damit verbundenen Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels (Kun u. Abood,1949). Die Injektion von Endotoxin führt beim Versuchstier zur Freisetzung von Adrenalin oder verwandten Substanzen, die entweder über eine Gefäßreaktion (Smith u. Thomas,1956, Sultzer u. Freedman,1965) oder durch eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels (Sanford,Barnett u. Gott,1960) schließlich den Tod verursachen. Die Toxizität von Endotoxin beruht einmal auf der Freisetzung von Histamin, Serotonin und Bradykinin, was zum akuten Rechtsherzversagen und zu Herzrhythmusstörungen führt, und zum anderen - später folgend - auf der Beeinträchtigung der Bluthomöostase (Lasch,1967). Im Falle des Hühnerembryos führt die nach Bakterien- oder Endotoxininjektion auftretende Hypoglykämie (Weidanz u. Shaffer,1962, Finkelstein,1964, Rifkind u. Palmer,1966) zum Tod der Keimlinge, wobei aber von Finkelstein (1964) hervorgehoben wird, daß es sich dabei auch um einen sekundären Prozess handeln könne.

Endotoxin könnte aber auch die Permeabilität von Körperzellen beeinträchtigen (Kessel u. Braun,1965) und zur Freisetzung von intrazellulärem Material, insbesondere Oligodesoxyribonukleotiden führen (Kessel,Braun u. Plescia,1966), die alle weiteren Veränderungen bedingen. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung bestärkt, daß Endotoxin an Muskelzellen der Lungenstrombahn das Membranpotential depolarisiert (Hildebrand u. Seys,1965).

Andererseits könnte Endotoxin seine Wirkungen aber auch über eine Aktivierung der aeroben Glykolyse entfalten (Woods et al,1961) oder nach Freisetzung lysosomaler Hydrolasen ei-

nen Block der induzierenden Enzymsysteme verursachen (Berry u. Smythe,1964).
Zur Zeit scheint es geboten, die toxische Wirkung von Endotoxin auf den Hühnerembryo nicht isoliert, sondern im Rahmen eines Gesamtgeschehens zu sehen. Möglicherweise besitzt bakterielles Lipopolysaccharid überhaupt keinen spezifischen Wirkungsort, sondern beeinträchtigt aufgrund der Gesamtstruktur des Moleküls oder mit hilfe besonderer Affinitäten zu Lipidstrukturen die Zellpermeabilität bevorzugter Zellgruppen so erheblich, daß es zum Austritt intrazellulären Materials kommt. Dabei scheinen nicht nur Oligodesoxyribonukleotide (Kessel,Braun u. Plescia,1966), Nukleinsäuren (Finger,1965), lysosomale Hydrolasen (Berry u. Smythe,1964) und biogene Amine (Lasch,1967) eine entscheidende Rolle zu spielen, sondern ebenso zellgebundene Proteine.
Die Überschwemmung des Gefäßsystems mit diesen Substanzen führt solange nicht zur Beeinträchtigung des physiologischen Gleichgewichts wie phagocytierende oder tolerante Gewebeelemente den Großteil des freigesetzten Materials resorbieren. In diesen Gewebeanteilen führen die Substanzen möglicherweise zu Enzyminduktionen, die wiederum die Phagocytose, Atmung, den Zellanabolismus usw. anregen, wie es von Woods et al (1961) für die aerobe Glykolyse diskutiert wird.
Steigt die Menge des intrazellulären Materials (abhängig von der Endotoxindosis und der Resistenz des Tieres) über ein bestimmtes Niveau, so treten Amine, Nukleinsäuren und Proteine in Zellen ein, die dann nur noch mit einer "Enzymverwirrung" reagieren können. Ein Zustand, der teils zur Dysfunktion teils aber auch zur Zerstörung der Zellen führt. Mit der Auflösung von nicht primär durch Endotoxin geschädigten Zellen setzt nach einer Latenzperiode eine zweite Phase der Kreislaufüberschwemmung mit intrazellulären Bestandteilen ein, der den Untergang des Organismus herbeiführt.
Als eigentliche Endotoxinwirkung könnte man demnach die Beeintrachtigung der Membranpermeabilität bevorzugter Zellen

bezeichnen. So gesehen müßten alle anderen beobachteten Effekte als sekundär aufgefasst werden.
Daß der Hühnerembryo altersabhängig gegen Endotoxin empfindlich ist, ließe sich mit dieser Auffassung vereinbaren. Die Zunahme der Phagocytosefähigkeit des RES, die Ausbildung der Nebennierenrinde (Smith u. Thomas,1956), die Fähigkeit der Blutglukosestabilisierung (Weidanz u. Shaffer,1962), die Ausbildung der eigentlichen Nierenfunktion (Finkelstein u. Ramm,1962) sind offensichtlich wichtige Teilfunktionen, deren Gesamtheit die Überlebenschance erhöht.
Sollte die Empfindlichkeit des Hühnerembryos nicht kontinuierlich abnehmen (Powell u. Finkelstein,1966), so könnte das mit einer bisher nicht bekannten, zu diesem Zeitpunkt auftretenden Änderung der Regulation des Stoffwechsels, des Kreislaufs o.ä. in Zusammenhang gebracht werden.

III. Versuche zur Detoxifizierung von bakteriellen Lipopolysacchariden

Unter A, III,3 wurde bereits auf die Möglichkeiten und die Ziele einer Detoxifizierung von bakteriellen Endotoxinen hingewiesen.
Die Trennung von Antigenität und Toxizität läßt sich mit verschiedenen Methoden und Substanzen erreichen. So mindern Cortison und verwandte Verbindungen (Smith u. Thomas, 1956, Berry u. Smythe, 1964) sowie Isoproterenol (Gruninger u. Spink, 1967) die Toxizität von Endotoxin.
Hingegen lassen sich mit folgenden Substanzen oder chemischen Behandlungsverfahren "Endotoxoidpräparationen" erhalten:

Acetylierung	Treffers, 1946, Freedman, Sultzer u. Kleinberg, 1961, Freedman u. Sultzer, 1962, Martin u. Marcus, 1966 I
Säure- oder alkalische Hydrolyse	Neter et al, 1956 Tripodi u. Nowotny, 1966
alkalisches Hydroxylamin	Tauber, Russell u. Guest, 1961
Bortrifluorid	Nowotny, 1963
Kaliummethylat	Nowotny, 1963 Martin u. Marcus, 1966 II
Kaliumperjodat	Martin u. Marcus, 1966 II
Lithiumaluminiumhydrid	Noll u. Braude, 1961
oxidierende Verbindungen	Suzuki, 1953, 1954
Pyridinformat	Nowotny, 1963 Martin u. Marcus, 1966 II

Andererseits wirken biologische Verbindungen oder Organsysteme ähnlich:

Serum oder Plasma	Hegemann, 1954 I, II
Cohn Fraktion IV_1	Rudbach u. Johnson, 1962
	Skarnes u. Chedid, 1964
	Oroszlan et al, 1966
	Skarnes, 1966
	Schultz u. Becker, 1967
	Gupta u. Reed, 1968
O-Antiserum	Nowotny, Radvany u. Neale, 1965
Antibiotika	Rifkind u. Palmer, 1966
	Rifkind, 1967
Gelatine	Woodside u. Fishel, 1967
Papain	Kim u. Watson, 1964
	Rudbach, Ribi u. Milner, 1965
Leber	Oroszlan, Mora u. Shear, 1963
	Corwin u. Farrar, 1964
	Farrar u. Corwin, 1966
Milz	Rutenberg u. Michael, 1964
	Rutenberg et al, 1966, 1967

Die Erklärung dieser Phänomene erfolgt in unterschiedlicher Weise: so werden einerseits unspezifische, elektrochemische Wechselwirkungen angenommen, da die Komplexbildung eine der hervorstechendsten Eigenschaften des Endotoxinmoleküls zu sein scheint (Nowotny, 1969), andererseits enzymatische Vorgänge postuliert (siehe A, III, 3).

Es wäre zu vermuten, daß die eintretenden chemischen Veränderungen beim Entgiftungsvorgang gewöhnlich nicht auf einen Teil oder eine Gruppe des Moleküls beschränkt bleiben (siehe Übersicht bei Nowotny, 1969). Vielmehr reagiert z.B. Säurehydrolyse mehr zufällig, indem es nicht nur empfindliche Bindungen löst, sondern auch irreversibel Strukturveränderungen hervorruft. Alkalische Hydrolyse ist zwar spezifischer,

trotzdem aber treten noch Strukturveränderungen auf. Auch spezifischere chemische Methoden werden kaum eine einzige Gruppe oder Bindung zerstören und es erscheint sehr schwierig, alle Veränderungen zu ergründen, die in einem Endotoxinmolekül auftreten.
Betrachtet man die Veränderungen der chemischen Struktur, läßt sich nicht übersehen, daß Fettsäuren oft in den Entgiftungsvorgang verwickelt sind. Oxidation, Säurehydrolyse, Acetylierung und besonders Säureabspaltung verändert die Anzahl kurz- und langkettiger Karboxylsäuren, die gewisse Regionen des Endotoxin mit einer unpolaren Schicht umgeben. Entgiftung mit $LiAlH_4$, alkalischem Hydroxylamin, Bortrifluorid und Kaliummethylat zerstört hingegen Esterbindungen. Die genaueren chemischen Veränderungen beim Entgiftungsvorgang lassen sich aber heute noch nicht beschreiben.

Faßt man die Detoxifizierungsstudien zusammen, so kommt man zu dem Ergebnis (Nowotny,1969), daß nicht eine bestimmte Partikelform oder -größe, sondern bestimmte funktionelle Gruppen im Endotoxinmolekül für die toxischen Wirkungen verantwortlich sind. Die Abstände und die Anordnung dieser gewissen Gruppen sind anscheinend für die toxische Struktur entscheidend. Werden diese entscheidenden Gruppen entfernt oder die Molekülstruktur verändert oder werden diese mit hilfe von Komplexbildungen maskiert, resultiert Entgiftung.

Wir zogen in unseren Untersuchungen Verbindungen heran, die vermuten ließen, daß sie entweder durch Komplexbildung (wie z.B. die Antibiotika Polymyxin-B-Sulfat und Colistinmethansulfonat) oder durch Eingriffe an den funktionellen Gruppen (Lysozym, Hydroxylamin) die toxischen Wirkungen bakterieller Endotoxine reduzieren oder aufheben.

1) Die Beeinflussung der toxischen Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide durch verschiedene Antibiotika

Colistinmethansulfonat und Polymyxin-B-Sulfat vermögen den toxischen Effekt von Endotoxin E.coli auf den Hühnerembryo völlig aufzuheben. Die mit der gleichen Endotoxindosis behandelten Kontrolltiere sterben zu 100%.
Andererseits zeigen Chloramphenicol, Penicillin-G-Kalium, Phenoxymethylpenicillinkalium, Sigmamycin, Streptomycinsulfat und Viomycinsulfat keinerlei Einfluß auf die Toxizität von Endotoxin E.coli.
Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Rifkind u. Palmer (1966) völlig überein.
Die neutralisierende Wirkung der kationischen, zyklischen Polypeptide Colistinmethansulfonat und Polymyxin-B-Sulfat auf die Toxizität von Endotoxin wurde bereits für den Hühnerembryo, das Kaninchen und adrenalektomierte Mäuse nachgewiesen (Rifkind u. Palmer, 1966, Rifkind, 1967 I, Rifkind, 1967 II). Darüberhinaus konnte das Shwartzmanphänomen (Rifkind, 1967 II) mit hilfe von Polymyxin-B-Sulfat unterdrückt werden.
Rifkind u. Palmer (1966) sowie Rifkind (1967 II) sehen als mögliche Erklärung spezifische, elektrochemische Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und Endotoxin an. Dabei erwägen sie als entscheidende Anteile einerseits die positiv geladenen Aminogruppen des Antibiotikums, andererseits die negativ geladenen Lipophosphatgruppen des Endotoxin.
Da andere zyklische polypeptische Antibiotika, wie z.B. Viomycinsulfat, keine Wirkung besitzen, vermuten sie einen spezifischen, d.h. von der Molekülkonfiguration abhängigen Mechanismus. Die Spezifität führen sie darauf zurück, daß die zyklischen, polypeptischen Antibiotika weitgehende Ähnlichkeit mit solchen Polypeptiden aufweisen, die zwischen Mukopeptiden der Bakterienzellwand und den Lipopolysacchariden gelagert sind.

Unsere Vorstellungen und experimentellen Befunde stehen mit dieser Hypothese in Einklang. Es wäre denkbar, daß die Antibiotika entweder die Membrankomponenten der Wirtszellen beeinflussen oder aber direkt mit dem Endotoxin reagieren (Übersicht über polyelektrisch wirksame Makromoleküle siehe bei Grossgebauer, 1967 II).

Da Rifkind (1967 II) zeigen kann, daß sich Endotoxine und derartige Antibiotika wechselseitig beeinflussen können, ist die Möglichkeit der direkten und spezifischen (Veränderung der stereometrischen Konfiguration einer Reaktionskomponente und Verhinderung einer Anlagerung an die Wirtszelle) Endotoxin-Antibiotikum-Wechselwirkung sehr wahrscheinlich.

2) Der Einfluß von Lysozym auf die toxische Wirkung von kommerziellem und vorgereinigtem bakteriellen Lipopolysaccharid

Die experimentellen Untersuchungen über die Wirkungen von Lysozym (N-Acetylmuramidglykanohydrolase) sind relativ zahlreich. Sie wurden zum größten Teil mit kommerziellem Lysozym aus Hühnereiklar durchgeführt und zeigen, daß der Einfluß dieses in zahlreichen Geweben und Sekreten vorkommenden Enzyms auf biologisch aktive Verbindungen vielfältiger Art ist. Dabei bleibt der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus sowie seine Bedeutung für die spezifische und unspezifische Infektionsabwehr häufig noch unklar (siehe auch Übersicht bei Grossgebauer u. Langmaack, 1968).
Bisher wurde insbesondere die Lysozymwirkung auf komplette Bakterien sowie Bakterienuntereinheiten untersucht, und es wurde gefunden, daß eine ganze Reihe grampositiver Bakterien ohne weiteres aufgelöst werden, während die bakteriolytische Wirkung des Lysozyms auf gramnegative Keime oft erst nach Anwendung bestimmter "Kunstgriffe" (Frieren - Tauen, osmotischer Schock, Zusatz von EDTA oder Aceton) sichtbar wird. Neben der Fähigkeit des Lysozyms, Proto- bzw. Sphäroplasten zu bilden, d.h. Bakterienzellwände abzubauen, ist die Bedeutung des Enzyms für die bakterizide Serumwirkung und die intrazelluläre Bakteriolyse von besonderem Interesse.

Verglichen mit den gründlichen und umfangreichen Studien, die sich mit der Lysozymwirkung auf Zellwände befassen, ist der Lysozymeffekt auf andere bakterielle Bausteine, wie z.B. das bakterielle Lipopolysaccharid, nur von Mergenhagen u. Martin (1964) sowie von Badakhsh u. Foster (1966) untersucht worden. Hinzu kommt, daß diese Autoren, die mit selbst gereinigten bakteriellen Lipopolysacchariden im Mäusetest arbeiteten, unterschiedliche Ergebnisse erzielen.

Die hohe Empfindlichkeit unseres Testsystems (Brutei) gegenüber Endotoxinen bot uns die Möglichkeit, die Lysozymwirkung auf bakterielles Lipopolysaccharid zu testen.

1. Einwirkung von Hühnerei-Lysozym auf kommerzielles hochgereinigtes Lipopolysaccharid

Zunächst ergab sich, daß die Toxizität kommerziellen Lysozyms auf den Hühnerembryo nicht linear vom Logarithmus der Dosis abhängt (siehe Abb. 1o). Lysozym-Endotoxin-Gemische (Inkubationszeit: 6o min bei 37,5°C) weisen gegenüber der Endotoxinkontrolle eine im Durchschnitt geringfügig gesteigerte Toxizität (7,7%) auf.
Allerdings muß betont werden, daß diese Toxizitätssteigerung nicht Ausdruck eines potenzierenden Lysozymeffektes sein muß. Das geht aus den Befunden hervor, die in der Abbildung 11 zusammengestellt wurden. Bei der Addition des toxischen Wirkungsanteils von Lysozym allein und Endotoxin allein ergibt sich nämlich stets eine höhere Gesamttoxizität als es das Inkubationsgemisch aufweist.
Zusammenfassend kommen wir daher zu der Auffassung, daß Lysozym die toxische Endotoxinwirkung im Bruteitest nicht signifikant erhöht, sondern im Gegenteil in einer Reihe von Versuchen geringfügig reduziert.

2. Einwirkung von Hühnerei-Lysozym auf schwach gereinigtes Lipopolysaccharid

Badakhsh u. Foster (1966) kommen auf grund von Mäuseversuchen (i.p. Zufuhr von mit Lysozym vorbehandelten Äther-Alkohol extrahierten B.abortus Lipopolysacchariden) zu dem Ergebnis, daß Lysozym die Toxizität des Keimextraktes zu reduzieren vermag. Sie halten es sogar für möglich, daß lysozymvorbehandelte (= detoxifizierte) Endotoxine als immunogen wirksame Substanzen ("Endotoxoid") verwendet werden könnten.
Unsere Befunde unter Verwendung von Äther- bzw. Phenolextrahierten E.coli o8 Keimen (siehe Fußnote S.76) bestätig-

ten die detoxifizierende Lysozymwirkung, wenn sie in unserem System auch nur geringfügig zum Ausdruck kommt (unveröffentl. eig. Untersuchungen).
Die endgültige Klärung dieser Frage, der unseres Erachtens nach praktische Bedeutung zukommen dürfte, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zumal andere Autoren (Mergenhagen u. Martin, 1964) einen gegenteiligen Lysozymeffekt beschrieben haben (Speziesunterschiede ? Einfluß der differenten Methoden ? Verunreinigungen ?).

Fußnote zur Seite 75:
Für die Überlassung der Bakterien E.coli o8 möchte ich Herrn Prof. O.Westphal auch an dieser Stelle verbindlichst danken.

3) Der Einfluß von Hydroxylamin auf verschiedene bakterielle Lipopolysaccharide

Hydroxylamin wurde bisher zur Klärung verschiedener Fragen herangezogen. So wurde die Wirkung auf Nukleinsäuren und deren Bruchstücke (Brown u. Schell,1961, Schuster,1961, Bendich et al,1964, Tessman, Ishiwa u. Kumar,1965, De Vries, 1965, Phillips, Brown u. Grossman,1966, Wilson u. Caicuts, 1966, Lawley,1967, Omura u. Yamaguchi,1967), auf Tropokollagen (Blumenfeld, Rojkind u. Gallop,1965) und verschiedene Enzyme (Wagner, Janata u. Hykes,1965, Valdiguié et al,1965) getestet. Zudem wurden substituierte Produkte des Hydroxylamin auf ihren Tumor- und Leukämie-heilenden Effekt hin untersucht (Giner-Sorolla, Medrek u. Bendich,1966, Giner-Sorolla et al,1966).

Innerhalb der mikrobiologischen Forschung wurde Hydroxylamin in erster Linie zur Inaktivierung von Viren und zur Mutationserzeugung von Bakteriophagen verwendet (Schäfer u. Rott, 1962, Tessman, Ishiwa u. Kumar,1965, Mietens,1966, Reda u. Ahmed,1967, Skehel u. Burke,1968).

Dabei ergaben sich zwei Gesichtspunkte: die Inaktivierungsstudien mit dieser Verbindung könnten sich als ein neuer Weg zur Klärung der funktionalen Bedeutung der Virusuntereinheiten erweisen (Grossgebauer,1966), da im Falle der Myxoviren eine schrittweise Inaktivierung der biologischen Effekte möglich war (Rott,1962, Scholtissek,1965). Ein anderer, praktischer Gesichtspunkt ist, Hydroxylamin zur Herstellung von Virusimpfstoffen zu verwenden, da die Infektiosität rasch und irreversibel zerstört werden kann (Schäfer u. Rott,1962).

Einen Überblick über die bisher beobachteten Hydroxylamineffekte auf unterschiedliche Substanzen gibt die Abb. 16.

Während der Einfluß von Hydroxylamin auf Virusprotein und Virusnukleinsäure gründlich studiert wurde, sind Untersuchungen über die Wirkung dieser Verbin-

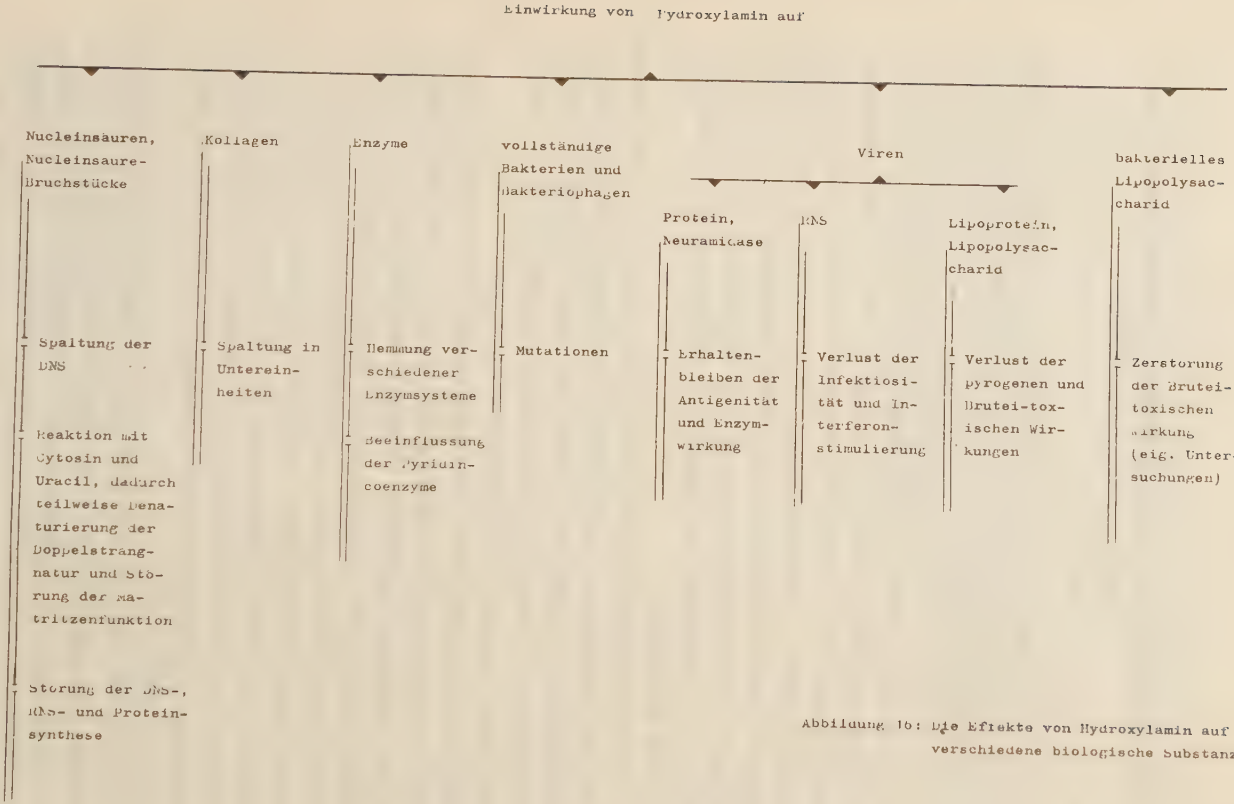


Abbildung 16: Die Effekte von Hydroxylamin auf verschiedene biologische Substanzen

dung auf Lipoproteine und Lipopolysaccharide nur in geringem Umfang ausgeführt worden (Tauber, Russell u. Guest, 1961). Untersuchungen an Viren haben Grossgebauer (1966), Schmidt, Grossgebauer u. Schmidt (1966) sowie Schmidt (1967) durchgeführt. Aus ihren Inaktivierungsstudien mit Hydroxylamin geht hervor, daß komplette Influenzaviren nach einer intensiven Behandlung mit dieser Verbindung nicht nur ihre infektiösen, sondern auch ihre toxischen, pyrogenen und interferierenden Eigenschaften verlieren. Sie sprechen daher die Vermutung aus, daß Hydroxylamin neben der Reaktion mit Virusnukleinsäurebausteinen möglicherweise auch auf die Viruslipidhülle einwirkt.

Endotoxin-Hydroxylamin-Wechselwirkungen sind bisher nur von Tauber, Russell u. Guest (1961) durchgeführt worden. Die Autoren entfernten von drei verschiedenen bakteriellen Endotoxinen durch Hydroxylamineinwirkung den Hauptlipidanteil und konnten dem lipidfreien Polysaccharid keine toxischen Wirkungen auf die Maus mehr zuordnen.
Uns scheint es wert zu sein, die detoxifizierende Wirkung von Hydroxylamin in einem empfindlicheren Versuchssystem (Hühnerei) reaktionskinetisch zu studieren.
Dabei werden der p_H-Bereich, die Einwirkungszeit des Hydroxylamins und die Konzentration der Endotoxine variiert, um optimale Inaktivierungseffekte aufzudecken.
Wir beobachteten, daß 1-molares Hydroxylamin im alkalischen Bereich von p_H 8.6 - 9.0 nach einer Einwirkungszeit von 4 Tagen Endotoxin insofern zu beeinflussen vermag, als deren toxische Effekte im Brutei weitgehend oder völlig aufgehoben sind.
Ein reiner p_H-Effekt sowie ein unspezifischer Salzeffekt konnten in Kontrollversuchen als Ursache für die Detoxifikationsphänomene ausgeschlossen werden, da die Toxizität des Endotoxin in den Kontrollansätzen (Endotoxin in alkalischem Puffer ohne Hydroxylamin bzw. mit 1-molarer Kochsalzlösung) nicht vermindert wurde.
Es ist interessant, daß im alkalischen Bereich 1.000 (E.co-

li) bis 1oo.ooo (S.enteritidis)-fach über dem entsprechenden LD 5o-Wert liegende Endotoxindosen nach 4-tägiger Hydroxylaminbehandlung nur mehr eine Toxizität von 5,9 bis 3,3 % aufweisen.
Es ist weiterhin bemerkenswert, daß die Toxizität von Endotoxin nach 24-stündiger Hydroxylamineinwirkung bereits auf 31,8% vermindert ist. Nach 48 Std. betrug sie nur noch 4,3%, nach 72 Std. wiederum 26,5%, um nach 96 Std. endgültig auf 0% zu fallen.
Die Annahme von Grossgebauer (1966), Schmidt, Grossgebauer u. Schmidt (1966) sowie Schmidt (1967), Hydroxylamin wirke außer auf Nukleinsäurebausteine auch auf die Viruslipidhülle, kann somit bestätigt werden. Die Detoxifizierung von Lipopolysacchariden durch Hydroxylamin wird evtl. durch Entfernung des Hauptanteils der Lipide erreicht (Nowotny, 1969).

Trotzdem kann der Wirkungsmechanismus des Hydroxylamin auf Endotoxin mit den vorliegenden Versuchsergebnissen nur hypothetisch erörtert werden.
Nukleinsäuren werden durch Hydroxylamin in Untereinheiten mit ca. 5oo Nukleotiden gespalten. Der Vorgang wird damit erklärt, daß die an der Verbindungsstelle eingebauten Aminosäuren oder Peptide aufgebrochen werden (Bendich et al, 1964). Andererseits soll Hydroxylamin die Spaltung von Tropokollagen durch Auflösung von Esterbindungen erreichen (Blumenfeld, Rojkind u. Gallop, 1965). Ebenso ist bekannt, daß Hydroxylamin mit Cytosin reagiert (Brown u. Schell, 1961, Schuster, 1961, Bendich et al, 1964, Tessman, Ishiwa u. Kumar, 1965, De Vries, 1965, Phillips, Brown u. Grossman, 1966, Wilson u. Caicuts, 1966, Lawley, 1967), dadurch sowohl das Molekül wie die Wasserstoffbindungskraft verändert und die Kopplung an das Basenpaar Guanin aufhebt oder aber, wenn es als Matritze dient, verhindert.

Es wäre denkbar, daß die Inaktivierung von Endotoxin nach ähnlichen Prinzipien zustande kommt.
Da bereits nach 48 Std. praktisch eine Aufhebung der tox-

ischen Wirkung im Brutei nachzuweisen ist, nach 3-tägiger Hydroxylaminvorbehandlung aber ein Anstieg der Mortalität resultiert, wären entweder mindestens zwei Wirkungsprinzipien mit verschiedenen Zeitmaxima zu fordern oder aber ein Vorgang mit diskontinuierlichem Ablauf.

Wir vermuten, daß die Aufhebung der Endotoxintoxizität auf eine Beeinträchtigung der Molekülkonfiguration zurückzuführen ist. Dabei gehen wir von der Annahme aus, daß gleichzeitig zwei Prozesse mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten starten. Der eine besteht darin, daß Hydroxylamin schrittweise mit bestimmten Molekülanteilen reagiert, die möglicherweise im Lipidanteil liegen, damit die räumliche Zuordnung entscheidender Reaktionszentren des Endotoxinmoleküls derart verschiebt, daß ein Produkt entsteht, das eine geringere Affinität zu den Wirtszellen aufweist. Da wir der Ansicht sind, daß die toxische Wirkung von Endotoxin in der Beeinträchtigung der Membranpermeabilität zu suchen ist, wäre eine Endotoxinstruktur mit einer verminderten Affinität zu Körperzellen weniger toxisch als die Ausgangssubstanz.

Der zweite langsamer verlaufende Prozess führt zur Erzeugung von Endotoxinbruchstücken, die noch teilweise toxisch wirken. Damit muß ein später auftretendes Toxizitätsmaximum mit verminderter Intensität erscheinen.

Die Entstehung von teilweise aktiven Endotoxinuntereinheiten setzt evtl. Reaktionszentren frei, die vor der Spaltung aus räumlichen Gründen nicht von Hydroxylamin blockiert werden konnten, oder zu denen Hydroxylamin ohnehin eine geringere Affinität besitzt. Nach der Spaltung können aber auch diese Reaktionszentren von Hydroxylamin angegriffen werden. So entsteht nach Ablauf beider Prozesse ein derart verändertes Endotoxinmolekül bzw. derart substituierte Bruchstücke, die keinerlei toxischen Effekt mehr auf den Hühnerembryo besitzen.

Weitere Untersuchungen müßten die Frage klären, ob es durch Hydroxylaminbehandlung tatsächlich zu einer Verminderung des

Molekulargewichts von Endotoxin kommt, d.h. ob die Annahme zutrifft, daß die Verminderung der toxischen Wirkung auf die Erzeugung von Endotoxinbruchstücke zurückgeht.
Dies ist insofern interessant, als anderen Autoren (Ribi et al,1966, Tarmina et al,1968 I u. II) zeigen konnten, daß mit der Verminderung des Molekulargewichts durch Natriumdesoxycholat auch ein biologischer Aktivitätsverlust einhergeht.

D. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von verschiedenen biologisch aktiven Verbindungen (Antibiotika, Lysozym, Hydroxylamin) auf die toxische Wirkung von bakteriellen Lipopolysacchariden im Bruteitest (intravenöse Injektionstechnik) untersucht.
Es ergeben sich folgende Befunde:

1) Die intravenöse Injektionstechnik am Brutei wurde durch Einführung einer einfachen Stützapparatur verbessert (nur geringfügige Ausfälle von Bruteiern aus methodisch bedingten Gründen).

2) Unter Verwendung von drei verschiedenen bakteriellen Lipopolysacchariden (E.coli, S.enteritidis, S.typhimurium) ergaben sich klar reproduzierbare Dosis-Wirkungsbeziehungen. Die Toxizität der Endotoxine steigt linear mit dem Logarithmus der Dosis.

3) Die Kombination von acht verschiedenen Antibiotika mit Endotoxin E.coli zeigt, daß nur Colistinmethansulfonat und Polymyxin-B-Sulfat den toxischen Lipopolysaccharideffekt herabzusetzen vermögen.
Chloramphenicol, Penicillin-G-Kalium, Phenoxymethylpenicillinkalium, Sigmamycin, Streptomycinsulfat und Viomycinsulfat besitzen keinerlei Effekt.

4) Lysozym (kommerziell, aus Hühnereiklar) zeigte mit hochgereinigtem Endotoxin E.coli eine additive Toxizitätssteigerung.

5) Hydroxylamin erwies sich als eine Endotoxin detoxifizierende Verbindung. Seine Wirkung hängt stark vom p_H des Inkubationsgemisches, von der Endotoxinkonzentration und von der Einwirkungszeit ab.
Im alkalischen Bereich (p_H 8.5) und nach intensiver

Einwirkung (4 Tage, 1-molar, 2o°C) ergaben sich optimale Bedingungen für eine Endotoxininaktivierung.

Die genannten Befunde werden einzeln diskutiert. Insbesondere wird auf die mögliche Endotoxinwirkungsweise im Hühnerembryo, die Gründe für die Wechselwirkungen zwischen Endotoxin einerseits und Antibiotika, Lysozym oder Hydroxylamin andererseits sowie auf die Herstellung von "Endotoxoiden" hingewiesen.

E. Schrifttumverzeichnis

1. Atkins,E.
1960, Pathogenesis of fever.
Physiol.Rev., 40, 580

2. Atkins,E., E.S.Snell
1965, Fever
IN: B.W.Zweifach,L.Grant,R.T.McCluskey (ed.),
The inflammatory process, Acad.Press,New York,
London, 495

3. Badakhsh,F.F., J.W.Foster
1966, Detoxification and immunogenic properties
of endotoxin-containing precipitate of Brucella abortus.
J.Bacteriol., 91, 494

4. Baker,P.J., J.B.Wilson
1965, Chemical composition and biological properties of the endotoxin of Brucella abortus.
J.Bacteriol., 90, 895

5. Baker,P.J., J.B.Wilson
1965, Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin.
J.Bacteriol., 90, 903

6. Benacerraf,B., P.Miescher
1960, Bacterial phagocytosis by the reticulo-endothelial system in vivo under different immune conditions.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 88, 184

7. Benacerraf,B., M.M.Sebestyen, S.Schlossman
1959, A quantitative study of the kinetics of blood clearance of P^{32}-labelled Escherichia coli and staphylococci by the reticulo-endothelial system.
J.Exptl.Med., 110, 27

8. Bendich,A., E.Borenfreund, G.C.Korngold, M.Krim, M.E.Balis
1963, Amino acids or small peptides as punctuation in the genetic code of DNA.
Estrato da "Acidi nucleici eloro-funzione biologica" convegno Antonio Baselli, Milano

9. Bennett,I.L.,jr., L.E.Cluff
1957, Bacterial pyrogens.
Pharmacol.Rev., 9, 427

10. Berczi,I.
1967, Endotoxin neutralizing effect of antisera to Escherichia coli endotoxin.
Z.Immunitätsforsch., 132, 303

11. Berger,F.M., G.M.Fukui
1963, Endotoxin induced resistance to infections and tolerance.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 114, 780

12. Berry,L.J., D.S.Smythe
1964, Effects of bacterial endotoxins on metabolism VII.Enzyme induction and cortisone protection
J.Exptl.Med., 120, 721

13. Biozzi,G., B.Benacerraf, B.N.Halpern
1955, The effect of Salmonella typhi and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system in mice.
Brit.J.Exptl.Pathol., 36, 226

14. Blumenfeld,O.O., M.Rojkind, P.M.Gallop
1965, Subunits of hydroxylamine-treated tropocollagen.
Biochem., 4, 1780

15. Brooke,M.S.
1965, Conversion of immunological paralysis to immunity by endotoxin.
Nature, 206, 635

16. Brown,D.M., P.Schell
1961, The reaction of hydroxylamine with cytosine and related compounds
J.molecular Biol., 3, 709

17. Brunner,K.T.
1962, Bildung von Antiendotoxin nach Injektion von Influenzavirus beim Kaninchen.
Path.Microbiol., 25, 91

18. Campbell,D.H., A.Cherkin
1945, The destruction of pyrogens by hydrogen peroxide.
Science, 102, 535

19. Cohn,Z.A., S.I.Morse
1960, Functional and metabolic properties of polymorpho-nuclear leucocytes. I. Observations on the requirements and consequences of particle ingestion.
J.Exptl.Med., 111, 667

20. Cohn,Z.A., S.I.Morse
1960, Functional and metabolic properties of polymorpho-nuclear leucocytes. II. The influence of a lipopolysaccharide endotoxin.
J.Exptl.Med., 111, 689

21. Cooper,K.E.
1966, Temperature regulation and the hypothalamus
Brit.Med.Bulletin, 22, 238

22. Corwin,L.M., W.E.Farrar,jr.
1964, Nature of the endotoxin-inactivating principle in guinea-pig liver.
J.Bacteriol., 87, 832

23. Cranston,W.I.
1966, Temperature regulation.
Brit.med.J., II, 69

24. Crutchley,M.J., D.G.Marsh, J.Cameron
1968, Biological studies on free endotoxin and a non-toxic material from culture supernatants fluids of Escherichia coli 078K80.
J.gen.Microbiol., 50, 413

25. Cundy,K.R., A.Nowotny
1968, Comparisons of five toxicity parameters of Serratia marcescens endotoxins.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 127, 999

26. Des Prez,R., R.Helman, J.A.Oates
1966, Inhibition of endotoxin fever by reserpine.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 122, 746

27. De Vries,G.
1965, Effets de l'hydroxylamine sur la structure secondaire de l'acide ribonucléique soluble.
Arch.Internat.Physiol.Biochim., 73, 867

28. Dubos,R.J., R.W.Schaedler
1956, Reversible changes in the susceptibility of mice to bacterial infections. I. Changes brought about by injection of pertussis vaccine or of bacterial endotoxins.
J.Exptl.Med., 104, 53

29. Eberhagen,D., G.Plette
1968, Zur Beeinflussung des Lipoidstoffwechsels in der Rattennebenniere, IV
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 349, 595

30. Eichenberger,E.
1966, Fieber und endogene Hyperthermie durch pharmakologische, immunologische und physikalische Maßnahmen.
IN: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band 16, Teil 15, Springer Verlag, 215

31. Farrar,W.E.
1965, Endotoxin detoxification by guinea pig tissue homogenates and possible significance of this reaction in vivo.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 118, 218

32. Farrar,W.E., L.M.Corwin
1966, The essential role of the liver in detoxification of endotoxin.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 668

33. Farrar,W.E., T.J.Magnani
1964, Endotoxin susceptibility following hepatic injury by carbon tetrachloride.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 115, 596

34. Field,T.E., J.G.Howard, J.L.Whitby
1955, Studies on the rapid production of a non-specific type of immunity to Salmonella typhi infection in mice.
J.Roy.Army Med.Corps., 101, 324

35. Finger,H.
1965, Steigerung der Serumantikörperbildung durch bakterielle Endotoxine.
Dt.Med.Wschr., 90, 533

36. Finkelstein,R.A.
1964, Observations on mode of action of endotoxin in chick embryos.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 115, 702

37. Finkelstein,R.A., G.M.Ramm
1962, Effect of age on susceptibility to experimental cholera in embryonated eggs.
J.Infect.Diseases, 11, 239

38. Fiszer-Szafarz,B.
1967, Effect of human cancerous serum on the chick embryo.
Canc.Res., 27, 191

39. Forbes,I.J.
1965, Induction of mitosis in macrophages by endotoxin.
J.Immunol., 94, 37

4o. Freedman,H.H.
196o, Passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin.
J.Exptl.Med., 111, 453

41. Freedman,H.H., B.M.Sultzer
1961, Modification of lethality of endotoxin in mice by zymosan.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1o6, 495

42. Freedman,H.H., B.M.Sultzer
1962, Dissociation of the biological properties of bacterial endotoxin by chemical modification of the molecule.
J.Exptl.Med., 116, 929

43. Freedman,H.H., B.M.Sultzer, W.Kleinberg
1961, Detoxification of bacterial endotoxins with retention of ability to stimulate non-specific resistance to infection.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1o7, 819

44. Frigerio,M.J., F.Kierszenbaum, M.R.Nejamkis
1966, Nonspecific resistance invoked by bacterial lipopolysaccharides against tuberculous infection.
Int.Arch.Allergy, 3o, 75

45. Fukui,G.M., E.Goldenbaum, F.M.Berger
1968, Effect of plasma on non-specific resistance to infection induced by endotoxin or protodyne.
Nature, 218, 362

46. Fukushi,K., R.L.Anacker, W.T.Haskins, M.Landy, K.C. Milner, E.Ribi
1964, I Extraction and purification of endotoxin from Enterobacteriaceae: A comparison of selected methods and sources.
J.Bacteriol., 87, 391

47. Fukushi,K., R.L.Anacker, W.T.Haskins, M.Landy, K.C. Milner, E.Ribi
1964, II Reaction of Escherichia coli endotoxin with lithium-aluminum hydride.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 115, 133

48. Gewurz,H., S.E.Mergenhagen, A.Nowotny, J.K.Phillips
1968, Interactions of the complement system with native and chemically modified endotoxins.
J.Bacteriol., 95, 397

49. Gewurz,H., H.S.Shin, S.E.Mergenhagen
1968, Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: Consumption of each of the six terminal complement components.
J.Exptl.Med., 128, 1049

50. Gilbert,R.P.
1960, Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin.
Phys.Rev., 40, 245

51. Gilbert,R.P.
1962, Endotoxin shock in the primate.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 111, 328

52. Giner-Sorolla,A., L.Medrek, A.Bendich
1966, Synthesis and biological activity of 9-β-D-Ribofuranosyl-6-hydroxylamino-purine.
J.Med.Chem., 9, 143

53. Giner-Sorolla,A., S.O'Bryant, J.H.Burchenal, A.Bendich
1966, The synthesis and properties of substituted 6-hydroxylaminopurines.
Biochem., 5, 3057

54. Göing,H., P.Kaiser
1966, Aufbau und Wirkungsweise bakterieller Endotoxine.
IN: Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und Experimentellen Therapie, Springer Verlag, 243

55. Greisman,S.E., W.E.Woodward
1965, Mechanisms of endotoxin tolerance. III.The refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin.
J.Exptl.Med., 121, 911

56. Griem,W.
1967, Ein Beitrag zur Durchführung von Toxizitätsprüfungen am bebrüteten Hühnerei.
Klin.Wschr., 45, 318

57. Grossgebauer,K.
1966, Der Einfluß von Hydroxylamin auf die antigene und interferierende Aktivität von Influenzaviren.
Z.Naturforsch., 21, 1063

58. Grossgebauer,K.
1967, I Virusbedingtes Fieber (Ergebnisse und Probleme)
Klin.Wschr., 45, 749

59. Grossgebauer,K.
1967, II Biologische Aktivitäten polyelektrolytwirksamer Makromoleküle.
Arch.Hyg.Bakt., 151, 360

60. Grossgebauer,K., H.Langmaack
1967, Eine Verbesserung der intravenösen Injektionstechnik beim embryonierten Hühnerei.
Z.med.Mikrobiol.Immunol., 153, 225

61. Grossgebauer,K., H.Langmaack
1968, Lysozyme, Ergebnisse und Probleme
Klin.Wschr., 46, 1121

62. Grossgebauer,K., H.D.Pohle, H.Langmaack
1968, Vermehrtes Auftreten von Lysozym im Liquor und Urin bei Fällen von Meningitis.
Klin.Wschr., 46, 1127

63. Grossgebauer,K., B.Schmidt, H.Langmaack
1968, Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of Staphylococci.
Appl.Microbiol., 16, 1745

64. Gruninger,R.P., W.W.Spink
1967, Protection against lethality of endotoxin with Isoproterenol: The chick embryo as an experimental model.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 124, 1277

65. Gupta,J.D., C.E.Reed
1968, The role of serum lipase in the degradation of Salmonella enteritidis endotoxin.
J.Immunol., 101, 308

66. Haskins,W.T., M.Landy, K.C.Milner, E.Ribi
1961, Biological properties of parent endotoxins and lipoid fractions with a kinetic study of acid-hydrolyzed endotoxin.
J.Exptl.Med., 114, 665

67. Hegemann,F.
1954, Zur Bedeutung des Blutserums für die Entstehung und das Unwirksamwerden bakterieller Reizstoffe beim Menschen. I. Die humorale Entstehung entzündungs- und fiebererregender Stoffe aus Colibakterien.
Z.Immunitätsforsch., 111, 202

68. Hegemann,F.
1954, Zur Bedeutung des Blutserums für die Entstehung und das Unwirksamwerden bakterieller Reizstoffe beim Menschen. II. Die neutralisierende Wirkung des menschlichen Serums auf das Endotoxin von Colibakterien.
Z.Immunitätsforsch., 111, 213

69. Hegemann,F., H.Lessmann
1958, Studies of the nature of the pyrogen-neutralizing factor in human blood. V. Occurrence of the endotoxin neutralizing serum factor in various animal species.
Z.Immunitätsforsch., 115, 391

70. Heilman,D.H.
1965, The selective toxicity of endotoxin for phagocytic cells of the reticuloendothelial system.
Int.Arch.Allergy, 26, 63

71. Heilman,D.H.
1968, In vitro toxicity of endotoxin for macrophages of young guinea pigs and rabbits.
Int.Arch.Allergy, 33, 501

72. Herion,J.C., J.K.Spitznagel, R.I.Walker, H.I.Zeya
1966, Pyrogenicity of granulocyte lysosomes.
Am.J.Phys., 211, 693

73. Hildebrand,G.J., Y.Seys
1965, Depolarizing action of endotoxin.
Nature, 206, 406

74. Howard,J.G., D.Rowley, A.C.Wardlaw
1958, Investigations on the mechanism of stimulation of non-specific immunity by bacterial lipopolysaccharides.
Immunol., 1, 181

75. Hughes,B.A., R.Lovell
1966, Virulence for chick embryos of Escherichia coli from cattle. I. LD 50 values, and the effects of dead bacteria, culture filtrates and crude endotoxin.
J.Comp.Pathol., 76, 171

76. Hughes,B.A., R.Lovell
1966, Virulence for chick embryos of Escherichia coli from cattle. II. Invasion and multiplication within chick embryos.
J.Comp.Pathol., 76, 181

77. Jenkin,C., D.L.Palmer
1960, Changes in the titre of serum opsonins and phagocytic properties of mouse peritoneal macrophages following injection of endotoxin.
J.Exptl.Med., 112, 419

78. Johnson,A.G., A.Anderson-Imbert
1965, Induction of tolerance to hypotension produced by gram-negative bacteria.
Bacteriol.Proc., 44,

79. Johnson,A.G., A.Nowotny
1964, Relationship of structure to function in bacterial O antigens. III. Biological properties of endotoxoids.
J.Bacteriol., 87, 809

80. Kanoh,S., H.Kohlhage, R.Siegert
1968, Pyrogenic principle of the ribonucleic acid from the yeast Candida utilis.
J.Bacteriol., 96, 738

81. Kaplan,C.
1960, Titration of vaccinia virus by intravenous injection of chick embryos.
Bull.Wld.Hlth.Org., 22, 393

82. Ke,Y.H., M.Ho
1967, Characterisation of virus- and endotoxin-induced interferons obtained from the serum and urine of rabbits.
J.Virol., 1, 883

83. Kessel,R.W.I., W.Braun
1965, Cytotoxicity of endotoxin in vitro. Effects on macrophages from normal guinea pigs.
Austr.J.Exptl.Biol.Med.Sci., 43, 511

84. Kessel,R.W.I., W.Braun
1966, Endotoxin-enhanced host resistance: Reversal by kinetin riboside.
Nature, 211, 1001

85. Kessel,R.W.I., W.Braun, O.J.Plescia
1966, Endotoxin cytotoxicity: Role of cell-associated antibody.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 121, 449

86. Kétyi,I.
1964, Endotoxin-Wertmessung in Hühnerembryonen
Zbl.Bakteriol., 192, 373

87. Kim,Y.B., D.W.Watson
1964, Inactivation of gram-negative bacterial endotoxins by papain.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 115, 140

88. Kim,Y.B., D.W.Watson
1965, Modification of host responses to bacterial endotoxins. II. Passive transfer of immunity to bacterial endotoxin with fractions containing 19 S antibodies.
J.Exptl.Med., 121, 751

89. Kim,Y.B., D.W.Watson
1966, Role of antibodies in reactions to gram-negative bacterial endotoxins.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 727

90. Kovats,T.G.
1961, Local endotoxin hypersensitivity and its relation to the Shwartzman phenomenon.
Nature, 190, 177

91. Kovats,T.G., P.Vegh
1967, Shwartzman reaction in endotoxin-resistant rabbits induced by heterologous endotoxin.
Immunol., 12, 445

92. Koy,A., A.S.McFarlane
1968, Effect of endotoxin on plasma albumin and fibrinogen synthesis rates in rabbits as measured by the ^{14}C-carbonate method.
Biochem.J., 108, 137

93. Kun,E., L.G.Abood
1949, Mechanism of inhibition of glycogen synthesis by endotoxins of Salmonella aertrycke and type I Meningococcus.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 71, 362

94. Landy,M., A.G.Johnson, M.E.Webster, J.F.Sagin
1955, Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. II. Immunological properties of the purified antigen.
J.Immunol., 74, 466

95. Landy,M., L.Pillemer
1956, Increased resistance to infection and accompanying alteration in properdin levels following administration of bacterial lipopolysaccharides.
J.Exptl.Med., 104, 383

96. Lasch,H.G.
1967, Pathophysiologie des Endotoxinschocks.
Med.Welt, 31, 1780

97. Lawley,P.D.
1967, Reaction of hydroxylamine at high concentration with deoxycytidine or with polycytidylic acid: Evidence that substitution of amino groups in cytosine residues by hydroxylamino is a primary reaction, and the possible relevance to hydroxylamine mutagenesis.
J.molecular Biol., 24, 75

98. Lee,L., C.A.Stetson
1960, Studies on the mechanism of the Shwartzman phenomenon. Accelerated cutaneous reactivity to bacterial endotoxins.
J.Exptl.Med., 111, 761

99. Leeson,T.S., C.R.Leeson
1963, The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation.
J.Anat., 97, 585

100. Martin,W.J., S.Marcus
1966, Detoxified bacterial endotoxins. I. Preparation and biological properties of an acetylated crude endotoxin from Salmonella typhimurium.
J.Bacteriol., 91, 1453

101. Martin,W.J., S.Marcus
1966, Detoxified bacterial endotoxins. II. Preparation and biological properties of chemically modified crude endotoxins from Salmonella typhimurium.
J.Bacteriol., 91, 1750

102. Marx,A., M.Musetescu, M.Sendrea, M.Mihalca
1968, Relationship between particle size and biological activity of Salmonella typhimurium endotoxin.
Zentr.Bakteriol.Parasitenk., 207, 313

103. Mergenhagen,S.E., G.R.Martin
1964, Properties of a lysozyme-dissociated endotoxic fraction from Escherichia coli.
J.Bacteriol., 88, 1169

104. Merritt,K., A.G.Johnson
1965, Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. VI. Enhancement of antibody formation by nucleic acids.
J.Immunol., 94, 416

105. Michael,J.G.
1966, The release of specific bactericidal antibodies by endotoxin.
J.Exptl.Med., 123, 205

106. Mietens,C.
1966, Einfluß der Inaktivierung mit Hydroxylamin auf die Antigenität von Poliomyelitis N-Antigen.
Arch.ges.Virusforsch., 18, 25

1o7. Milner,K.C., R.L.Anacker, K.Fukushi, W.T.Haskins, M.Landy, B.Malmgren, E.Ribi
1963, Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. III. Structure and biological properties of surface antigens from gram-negative bacteria.
Bacteriol.Rev., 27, 352

1o8. Milner,K.C., R.A.Finkelstein
1966, Bioassay of endotoxin: Correlation between pyrogenicity for rabbits and lethality for chick embryos.
J.Infect.Diseases, 116, 529

1o9. Mizuno,D., O.Yoshioka, M.Akamatu, T.Kataoka
1968, Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide.
Canc.Res., 28, 1531

11o. Morgan,W.T.J., S.M.Partridge
1942, An examination of the O antigenic complex of Bact. typhosum
Brit.J.Exptl.Pathol., 23, 151

111. Mulholland,J.H., L.E.Cluff
1964, The effect of endotoxin upon susceptibility to infection. The role of the granulocyte.
IN: M.Landy u. W.Braun (ed.), Bacterial endotoxins, Rutgers University Press, New Brunswick(N.J.) 211

112. Neter,E., E.A.Gorzynski, O.Westphal, O.Lüderitz, D.J.Klumpp
1958, The effect of protamine and histone on enterobacterial lipopolysaccharides and hemolysis.
Can.J.Microbiol., 4, 371

113. Neter,E., O.Westphal, O.Lüderitz, E.A.Gorzynski, E.Eichenberger
1956, Studies of enterobacterial lipopolysaccharides. Effects of heat and chemical on erythrocyte modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties.
J.Immunol., 76, 377

114. Netzer,W., W.Vogt
1964, Anaphylatoxin formation by a pyrogenic lipopolysaccharide.
Arch.Exptl.Pathol., 248, 261

115. Noble,R.E., D.Koch-Weser
1966, In vitro inhibition of leukocyte uptake of radioactive endotoxin by components of normal serum.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 121, 541

116. Noll,H., A.I.Braude
1961, Preparation and biological properties of a chemically modified Escherichia coli endotoxin of high immunogenic potency and low toxicity.
J.Clin.Invest., 40, 1935

117. Norpoth,K., H.M.Rauen
1968, Tumorwachstum auf der Chorioallantoismembran im bebrüteten Hühnerei.
Z.Krebsforsch., 71, 140

118. Nowotny,A.
1963, Endotoxoid preparations.
Nature, 197, 721

119. Nowotny,A.
1968, Immunogenicity of toxic and detoxified endotoxin preparations.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 127, 745

12o. Nowotny,A.
1969, Molecular aspects of endotoxic reactions.
Bacteriol.Rev., 33, 72

121. Nowotny,A., R.Radvany, N.L.Neale
1965, Neutralization of toxic bacterial O-antigens with O-antibodies while maintaining their stimulus on non-specific resistance.
Life Sci., 4, 1107

122. Oh,J.O., E.J.Gill
1966, Role of interferon-like viral inhibitor in endotoxin-induced corneal resistance to Newcastle Disease Virus.
J.Bacteriol., 91, 251

123. Omura,H., K.Yamaguchi
1967, Action of hydroxylamine on deoxyribonucleic acid in vitro.
Enzymol., 33, 1

124. Oroszlan,S., V.W.McFarland, P.T.Mora, M.J.Shear
1966, Reversible inactivation of an endotoxin by plasma proteins.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 622

125. Oroszlan,S.I., P.T.Mora, M.J.Shear
1963, Reversible inactivation of an endotoxin by intracellular protein.
Biochem.Pharmacol., 12, 1131

126. Patterson,L.T., J.M.Harper, R.D.Hegginbotham
1968, Association of C-reactive protein and circulating leukocytes with resistance to Staphylococcus aureus infection in endotoxin-treated mice and rabbits.
J.Bacteriol., 95, 1375

127. Phillips,J.H., D.M.Brown, L.Grossman
1966, The efficiency of induction of mutations by hydroxylamine.
J.molecular Biol., 21, 4o5

128. Postic,B., C.DeAngelis, M.K.Breinig, M.Ho
1966, Effect of temperature on the induction of interferons by endotoxins and virus.
J.Bacteriol., 91, 1277

129. Powell,C.J., R.A.Finkelstein
1966, Virulence of Escherichia coli strains for chick embryos.
J.Bacteriol., 91, 141o

13o. Radvany,K., N.L.Neale, A.Nowotny
1966, Relation of structure to function in bacterial O-antigens. VI. Neutralization of endotoxic O-antigens by homologous O-antibody.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 763

131. Reda,I.M., A.A.S.Ahmed
1967, Über das Verhalten von Newcastle Disease-Virusstämmen verschiedener Pathogenität gegenüber Äther- und Hydroxylamin-Behandlung.
Zbl.Vet.Med., 14, 657

132. Ribi,E., R.L.Anacker, R.Brown, W.T.Haskins, B.Malmgren, K.C.Milner, J.A.Rudbach
1966, Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate.
J.Bacteriol., 92, 1493

133. Ribi,E., R.L.Anacker, K.Fukushi, W.T.Haskins, M.Landy, K.C.Milner
1964, Relationship of chemical composition to biological activity.
IN: M.Landy u.W.Braun (ed.),Bacterial endotoxins, Rutgers University Press,New Brunswick (N.J.)
16

134. Ribi,E., W.T.Haskins, M.Landy, K.C.Milner
1961, Symposium on bacterial endotoxin. I. Relationship of chemical composition to biological activity.
Bacteriol.Rev., 25, 427

135. Ribi,E., W.T.Haskins, K.C.Milner, R.L.Anacker, D.B. Ritter, G.Goode, K.J.Trapani, M.Landy
1962, Physicochemical changes in endotoxin associated with loss of biological potency.
J.Bacteriol., 84, 8o3

136. Ribi,E., B.H.Hoyer, K.C.Milner, T.D.Perrine, C.L. Larson, G.Goode
196o, Physical and chemical analysis of endotoxin from Salmonella enteritidis.
J.Immunol., 84, 32

137. Rifkind,D.
1967, I Prevention by Polymyxin B of endotoxin lethality in mice.
J.Bacteriol., 93, 1463

138. Rifkind,D.
1967, II Studies on the interaction between endotoxin and Polymyxin B.
J.Infect.Diseases, 117, 433

139. Rifkind,D., J.D.Palmer
1966, Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics.
J.Bacteriol., 92, 815

14o. Rott,R.
1962, Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden nichtinfektiösen virusspezifischen Einheiten.
Habilitationsschrift, Tübingen

141. Rowley,D.
1955, Stimulation of natural immunity to Escherichia coli infections. Observations in mice.
Lancet, 1, 232

142. Rowley,D.
1956, Rapidly induced changes in the level of non-specific immunity in laboratory animals.
Brit.J.Exptl.Pathol., 37, 223

143. Rowley,D.
1960, The role of opsonins in non-specific immunity.
J.Exptl.Med., 111, 137

144. Rudbach,J.A., R.L.Anacker, W.T.Haskins, A.G.Johnson, K.C.Milner, E.Ribi
1966, Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 629

145. Rudbach,J.A., A.G.Johnson
1962, Changes in serologic reactivity of endotoxin induced by fraction IV (Cohn) of normal human serum.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 111, 651

146. Rudbach,J.A., A.G.Johnson
1964, Restoration of endotoxin activity following alteration by plasma.
Nature, 202, 811

147. Rudbach,J.A., A.G.Johnson
1966, Alteration and restoration of endotoxin activity after complexing with plasma proteins.
J.Bacteriol., 92, 892

148. Rudbach,J.A., K.C.Milner
1968, Reaction of endotoxin and surfactants. III. Effect of sodium lauryl sulfate on the structure and pyrogenicity of endotoxin.
Can.J.Microbiol., 14, 1173

149. Rudbach,J.A., E.Ribi, K.C.Milner
1965, Reactivation of a papain-treated endotoxin.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 119, 115

15o. Rutenburg,S., J.G.Michael
1964, Endotoxin-detoxifying capacity of reticulo-endothelial system in normal and Pertussis-treated mice.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 117, 3o1

151. Rutenburg,S., A.Rutenburg, E.Smith, J.Fine
1966, Detoxification of endotoxin by spleen.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 663

152. Rutenburg,S., R.Skarnes, C.Palmerio, J.Fine
1967, Detoxification of endotoxin by perfusion of liver and spleen.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 125, 455

153. Sanford,J.P., J.A.Barnett, C.Gott
1960, A mechanism of the glycogenolytic action of bacterial endotoxin.
J.Exptl.Med., 112, 97

154. Schäfer,W., R.Rott
1962, Herstellung von Virusvaccinen mit Hydroxylamin. Verlauf der Inaktivierung und Wirkung des Hydroxylamins auf verschiedene biologische Eigenschaften einiger Viren.
Zschr.Hyg.Infekt.Kr., 148, 256

155. Schmidt,G.
1967, Tierexperimentelle Untersuchungen über die pyrogene Aktivität von Myxoviren und bakteriellen Toxinen.
Inaugural-Dissertation, Math.Nat.Fak. FU Berlin

156. Schmidt,G., K.Grossgebauer, B.Schmidt
1966, Die selektive Zerstörung der pyrogenen Aktivität von Influenzaviren durch Hydroxylamin.
Arch.Virusforsch., 18, 105

157. Scholtissek,C.
1965, Biochemische Studien zur Vermehrung der Myxoviren.
Zbl.Vet.Med., Reihe B, 12, 351

158. Schrader,W.H., B.F.Woolfrey, R.D.Brunning
1964, Studies with tritiated endotoxin. III. The local Shwartzman reaction.
Am.J.Pathol., 44, 597

159. Schultz,D.R., E.L.Becker
1967, The alteration of endotoxin by postheparin plasma and its purified fractions. I. Comparison of the ability of guinea pig postheparin and normal plasma to detoxify endotoxin.
J.Immunol., 98, 473

160. Schultz,D.R., E.L.Becker
1967, The alteration of endotoxin by postheparin plasma and its purified fractions. II. Relationship of the endotoxin detoxifying activity of euglobulin from postheparin plasma to lipoprotein lipase.
J.Immunol., 98, 482

161. Schuster,H.
1961, The reaction of Tobacco Mosaic Virus ribonucleic acid with hydroxylamine.
J.molecular Biol., 3, 447

162. Shilo,M.
1959, Nonspecific resistance to infections.
Ann.Rev.Microbiol., 13, 255

163. Skarnes,R.C.
1966, The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 644

164. Skarnes,R.C., L.C.Chedid
1964, Biological degradation and inactivation of endotoxin (chromate-labeled).
IN: M.Landy u.W.Braun (ed.),Bacterial endotoxins, Rutgers University Press,New Brunswick (N.J.) 575

165. Skehel,J.J., D.C.Burke
1968, Interferon production by Semliki Forest Virus inactivated with hydroxylamine.
J.gen.Virol., 3, 35

166. Smith,R.T., L.Thomas
1956, The lethal effect of endotoxins on the chick embryo.
J.Exptl.Med., 1o4, 217

167. Stefanovic,J., O.Absolonova
1966, Antibacterial and proteolytic activity of rabbit phagocytes and the effect of temperature and endotoxin on this activity.
Folia Microbiol., 11, 358

168. Stetson,C.A.,jr.
1955, Studies on the mechanism of the Shwartzman phenomenon.
J.Exptl.Med., 1o1, 421

169. Stetson,C.A.,jr.
1961, Symposium on bacterial endotoxins. IV. Immunological aspects of the host reaction to endotoxins.
Bacteriol.Rev., 25, 457

17o. Stinebring,W.R., J.S.Youngner
1964, Patterns of interferon appearance in mice injected with bacteria or bacterial endotoxin.
Nature, 2o4, 712

171. Sugiyama,H., T.Hayama, O.Yagasaki
1966, Emetic action of bacterial endotoxin in the cat.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 121, 278

172. Sultzer,B.M., H.H.Freedman
1965, Endotoxin-induced susceptibility to staphylococcal infection and its reversal by adrenergic blocking agents.
J.Bacteriol., 9o, 1oo1

173. Suter,E.
1964, Hyperreactivity to endotoxin after infection with BCG. Studies on its distinguishing properties.
J.Immunol., 92, 49

174. Suzuki,S.
1953, Studies on the preparation of non-pyrogenic drugs for injection. I. Removal of TBP reaction positine substances by the usual refining process.
J.Pharm.Soc.Japan, 73, 615

175. Suzuki,S.
1954, Studies on the preparation of non-pyrogenic drugs for injection. III. Quinone treatment.
J.Pharm.Soc.Japan, 74, 9o

176. Suzuki,T., H.Y.Whang, E.A.Gorzynski, E.Neter
1964, Inhibition by lipopolysaccharide (endotoxin) of antibody response of rabbit to common antigen of Enterobacteriaceae.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 117, 785

177. Tarmina,D.F., K.C.Milner, E.Ribi, J.A.Rudbach
1968, I Reaction of endotoxin and surfactants. II. Immunologic properties of endotoxins treated with sodium deoxycholate.
J.Immunol., 1oo, 444

178. Tarmina,D.F., K.C.Milner, E.Ribi, J.A.Rudbach
1968, II Modification of selected host-reactive properties of endotoxin by treatment with sodium deoxycholate.
J.Bacteriol., 96, 1611

179. Tauber,H., H.Russell, W.J.Guest
1961, Nature of polysaccharides obtained from endotoxins by hydroxylaminolysis.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1o7, 964

18o. Tessman,I., H.Ishiwa, S.Kumar
1965, Mutagenic effects of hydroxylamine in vivo.
Science, 148, 5o7

181. Treffers,H.P.
1946, The detoxification by acetylation of soluble antigens from Shigella dysenteriae (Shiga) and E.typhosa.
Science, 1o3, 387

182. Tripodi,D., A.Nowotny
1966, Relation of structure to function in bacterial O-antigens. V. Nature of active sites in endotoxic lipopolysaccharides of Serratia marcescens.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 133, 6o4

183. Urbaschek,B., A.Nowotny
1968, Endotoxin tolerance induced by detoxified endotoxin (endotoxoid).
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 127, 650

184. Urbaschek,B., R.Versteyl, D.Götte
1965, Histaminverstärkende Wirkung von Endotoxinen aus verschiedenen gramnegativen Keimen.
Klin.Wschr., 18, 1012

185. Valdiguié,P., L.Douste-Blazy, J.Castro, J.-C.Dousset
1965, Sur les mécanismes biochimiques de l'intoxication par l'hydroxylamine.
Ann.Biol.clin., 23, 25

186. Wagner,J., Vl.Janata, P.Hykes
1965, The influence of hydroxylamine and phenylhydroxylamine upon the activity of some enzymes of the glycide metabolism and upon ATP formation in erythrocytes.
Acta Univ.Car.Med.Suppl., 21, 179

187. Watson,D.W., Y.B.Kim
1964, Immunological aspects of pyrogenic tolerance.
IN: M.Landy u.W.Braun (ed.),Bacterial endotoxins, Rutgers University Press,New Brunswick (N.J.) 522

188. Webster,M.E., J.F.Sagin, M.Landy, A.G.Johnson
1955, Studies on the O antigen of Salmonella typhosa. I. Purification of the antigen.
J.Immunol., 74, 455

189. Weidanz,W.P., M.F.Shaffer
1962, Hypoglycemia in chick embryos infected with S.typhosa via the allantoic cavity.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 111, 655

190. Wendt,F.
1959, Neue Ergebnisse der Pyrogenforschung.
Dt.Med.Wschr., 84, 2084

191. Westphal,O., I.Beckmann, U.Hämmerling, B.Jann, K. Jann, O.Lüderitz
1964, Recent investigations on the polysaccharide component of enterobacterial endotoxins (S and R forms).
Proc.of a Symposium at the Institute of Microbiology of Rutgers, New Brunswick (N.J.)

192. Westphal,O., O.Lüderitz
1954, Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien.
Angew.Chemie, 66, 407

193. Westphal,O., A.Nowotny, O.Lüderitz, H.Hurni, E.Eichenberger, G.Schönholzer
1958, Die Bedeutung der Lipoid-Komponente (Lipoid A) für die biologischen Wirkungen bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharide).
Pharm.Acta Helv., 33, 401

194. Whitby,J.L., J.G.Michael, M.W.Woods, M.Landy
1961, Symposium on bacterial endotoxins. II. Possible mechanisms whereby endotoxins evoke increased non-specific resistance to infection.
Bacteriol.Rev., 25, 437

195. Wiener,E., A.Beck, M.Shilo
1965, Effect of bacterial lipopolysaccharides on mouse peritoneal leukocytes.
Labor.Invest., 14/5, 457

196. Wilson,R.G., M.J.Caicuts
1966, The effect of hydroxylamine on the template properties of polycytidylic acid.
J.Biol.Chem., 241, 1725

197. Wood,W.B.
1966, Die Pathogenese des Fiebers.
IN: Das medizinische Prisma, Bd. 3, C.H.Boehringer Sohn, Ingelheim am Rhein

198. Woods,M.W., M.Landy, J.L.Whitby, D.Burk
1961, Symposium on bacterial endotoxins. III. Metabolic effects of endotoxins on mammalian cells.
Bacteriol.Rev., 25, 447

199. Woodside,E.E., C.W.Fishel
1967, Alteration of endotoxin toxicity after complexing with gelatin.
Federation Proc., 26, 583

2oo. Youngner,J.S., W.R.Stinebring
1965, Interferon appearance stimulated by endotoxin, bacteria or viruses in mice pre-treated with Escherichia coli endotoxin or infected with Mycobacterium tuberculosis.
Nature, 2o8, 456

2o1. Youngner,J.S., W.R.Stinebring
1966, Comparison of interferon production in mice by bacterial endotoxin and statolon.
Virology, 1, 31o

2o2. Zeya,H.I., J.K.Spitznagel
1963, Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: Separation and identification.
Science, 142, 1o85

Danksagung

Mein ergebener Dank gilt Herrn Professor Dr.med. K.Grossgebauer für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die freundliche Bereitstellung alles benötigten Materials. Darüberhinaus sage ich Herrn Professor Dr.med. K. Grossgebauer und Fräulein Dr.med. H.Langmaack meinen aufrichtigen Dank für die uneigennützige Unterstützung und die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Zusammenstellung der Arbeit.

Herrn Professor Dr.med. O.Westphal danke ich verbindlich für die Überlassung der E.coli o8 Keime.

Meine Anerkennung gilt auch Fräulein U.Rohlfing für ihre Hilfe bei der Vorbereitung der Experimente.

Lebenslauf

Am 1o. Mai 1942 wurde ich als zweites Kind des Reichsangestellten Karl Schmidt und seiner Ehefrau Ruth S. geb. Lehnert in Berlin geboren.
Ab September 1948 besuchte ich die 8.Grundschule und absolvierte im März 1961 auf einem neusprachlich-mathematischen Gymnasium in Berlin 46 das Abitur.
Anschließend meldete ich mich drei Jahre zur Bundeswehr, bei der ich die Ausbildung zum Offizier (Zeit) durchlief und ein Jahr aktiv als Leutnant in der Truppe tätig war.
Im Sommersemester 1964 begann ich an der FU Berlin das Medizinstudium, blieb auch während der klinischen Studienzeit in Berlin und bestand hier im Februar 197o das Staatsexamen.
Im Frühjahr 1969 habe ich geheiratet.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33